



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

“Efecto de patrones moleculares asociados a patógenos, sobre el estado de activación del receptor para hidrocarburos arilo (AhR) y el receptor X para pregnano (PXR)”

TESIS

Que presenta

Biol. Carlos Daniel Bautista Olivier

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA CELULAR

DIRECTORES DE TESIS: Dr. Guillermo Elizondo Azuela

Dr. Leopoldo Flores Romo

Ciudad de México

JULIO 2020

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, y a Fany, los cuales me han brindado todo su amor a lo largo de estos años y sin ellos nada de esto sería posible, esto logro es de ustedes.

Al CINVESTAV Unidad Zacatenco y al Departamento de Biología Celular, por aceptarme en su programa de posgrado, y brindarme una magnifica formación.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Guillermo Elizondo Azuela por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, además de guiarme, comprenderme y apoyarme no solo en el ámbito de la ciencia, si no, como ser humano.

Una dedicatoria y agradecimiento al Dr. Leopoldo Flores Romo (QEPD), el cual realizó grandes aportaciones a la elaboración de este proyecto, pero además siempre fue un excelente profesor y persona, mi cariño y respeto por siempre.

A la Dra. Mireya de la Garza Amaya y al Dr. Enrique Othón Hernández, por las aportaciones y sugerencias para la elaboración de este proyecto.

A la Dra. María Asunción Cabañas, por su enseñanza y colaboración en la parte experimental de este proyecto, en el manejo y cuidado de los animales de laboratorio, así como en el desarrollo de técnicas de extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real.

Al Sr. Salvador Portilla, por su asistencia técnica y compañía.

A Jaime Herrera por brindarme su apoyo y asistencia en el manejo del microscopio confocal.

A mis compañeros del laboratorio 20 de Biología Celular y laboratorio 30 de Toxicología, los cuales me brindaron su apoyo, consejos y compañía.

A mis compañeros y amigos de la generación 2018 – 2020 de Maestría los cuales hicieron mi estancia en este departamento muy grata.

A la Dra. Guadalupe Reyes Cruz y al Dr. Juan Pedro Luna Arias, por su esmero y paciencia en el área de la coordinación académica.

A todos los profesores titulares de este departamento, los cuales siempre transmiten su conocimiento y consejos a nuestro ímpetu saber.

A Clara Hernández Chávez y Blanca Estela Olguin Cosio, por su asistencia administrativa, además de su paciencia y amor por su trabajo.

Al CONACYT por brindarme el apoyo para la realización de este posgrado con la beca 924973 y los recursos provenientes del proyecto Conacyt CB-280897.

ABREVIATURAS

AhR – Receptor para hidrocarburos arilo

AIM2 - Ausente en melanoma 2

ANOVA – Análisis de varianza

APC – Célula presentadora de antígenos

ARNT – Translocador nuclear del receptor de arilos

ATP – Adenosín trifosfato

BSA - Albúmina sérica bovina

°C – Grados Celsius

CAR – Receptor constitutivo para androstano

CARD – Dominio de reclutamiento de caspasas

CCRP – Proteína de retención citoplásmica de CAR

CO₂ – Dióxido de carbono

CPR – Citocromo P450 reductasa

CYP450 – Citocromo P450

DAI - Activador de factores regulatorios de IFN-I

DAMPs – Patrones moleculares asociados a daño

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DBD – Dominio de unión a DNA

DC – Célula dendrítica

DTT – Diclorofeniltricloroetano

DENV-2 – Virus del Dengue serotipo 2

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ER – Elementos de respuesta

FAD – Flavin adenin dinucleótido

FMN – Flavin mononucleótido

GP – Glicoproteína
HAHs – Hidrocarburos aromáticos halogenados
IFN-I – Interferón 1
IL – Interleucina
LBD – Dominio de unión a ligando
LP – Lipoproteína
LPS – Lipopolisacárido
LRR - Repetidos ricos en leucina
MΦ's – Macrófagos
mRNA – RNA mensajero
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro
NADP – Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
NES – Señal de exporte nuclear
NF-κB - Factor nuclear kappa B
NLR – Receptor tipo NOD
NLS – Señal de localización nuclear
NOD - Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
PAHs – Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PAMPs – Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS – Solución buffer de fosfatos
PCDFs –Dibenzofuranos policlorinados
PCN - Pregnenolona 16α-carbonitrilo
PCR – Reacción en cadena de la polimerasa
PCDDs –Dibenzo-*p*-dioxinas policlorinados
PFA – Paraformaldehído
PGN – Péptidoglicano
PP2A – Proteín fosfatasa 2 A
PPAR – Receptor activado por proliferadores del peroxisoma

PRR – Receptor de reconocimiento de patrones
PXR – Receptor X para pregnano
RE – Retículo endoplásmico
RIG-I – Gen inducible por ácido retinoico
RLR – Receptor tipo RIG-I
RNA – Ácido ribonucleico
RXR – Receptor X para retinoides
TCDD - 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina
TIR - Toll – IL-1
TLR - Receptor tipo Toll
TNF α – Factor de necrosis tumoral alfa
UFP – Unidades formadora de placas
V – Voltios
XREM – Módulo potenciador de respuesta a xenobióticos
Zym – Zimosano

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Xenobióticos	4
2.2. Enzimas metabolizadoras de xenobióticos	4
2.3. Citocromo P450	6
2.4. Inducción de citocromo P450	7
2.5. Receptor para hidrocarburos arilo (AhR)	10
2.6. Receptor X para pregnano (PXR)	12
2.7. Sistema inmune innato	14
2.8. Receptor de reconocimiento de patrones (PRRs)	15
3. ANTECEDENTES	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVO GENERAL	20
6.1. OBJETIVOS PARTICULARES	20
7. MÉTODOS	21
7.1. Obtención de macrófagos peritoneales	21
7.2. Cultivo celular	21
7.3. Tratamientos	22
7.4. Ensayo de citotoxicidad por MTT	22
7.5. Extracción de RNA	23

7.6. PCR cuantitativo en tiempo real (RT - qPCR)	23
7.7. Inmunofluorescencia	24
7.8. Análisis estadístico	25
8. RESULTADOS	26
8.1. El TCDD no disminuye la viabilidad celular de los macrófagos peritoneales de ratón	26
8.2. El PCN no disminuye la viabilidad celular de los macrófagos peritoneales de ratón	27
8.3. El TCDD induce la expresión del <i>Cyp1a1</i> en macrófagos peritoneales de ratón	28
8.4. El PCN induce la expresión del <i>Cyp3a11</i> en macrófagos peritoneales de ratón	29
8.5. Efecto de los PAMPs sobre la expresión del <i>Cyp1a1</i>	30
8.6. Efecto de los PAMPs sobre la expresión del <i>Cyp3a11</i>	31
8.7. Localización celular del AhR y PXR en macrófagos peritoneales de ratón	32
9. DISCUSIÓN	35
10. CONCLUSIONES	42
11. PERSPECTIVAS	43
12. BIBLIOGRAFIA	44

1. RESUMEN

A través del tiempo, los seres vivos han interactuado con diferentes clases de moléculas ajenas a las producidas por sí mismos. Estos agentes externos son conocidos como xenobióticos, que, por su naturaleza, se acumulan a niveles tóxicos provocando efectos adversos en el organismo. A lo largo de la evolución, diferentes proteínas se han especializado para reconocer a dichos xenobióticos. Estos xenosensores actúan como factores de transcripción dependientes de ligando, que al unirse a una gran variedad de compuestos promueven la expresión de enzimas metabolizadoras que, a su vez, biotransforman a los xenobióticos en compuestos más solubles y polares, para poder ser eliminados del organismo. Dentro de los xenosensores, el receptor para hidrocarburos arilo (AhR) y el receptor X para pregnano (PXR) han sido reconocidos por su capacidad de no solo reconocer xenobióticos, sino, además, de inducir una respuesta inmune innata y adaptativa ante la presencia de microorganismos. En el presente trabajo se investigó si el AhR y el PXR pueden ser activados mediante diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Para cumplir con dicha meta, macrófagos peritoneales de ratón fueron tratados con lipopolisacárido (LPS), péptidoglicano (PGN), zimosano (Zym) y un sonicado del virus del dengue serotipo 2 (DENV-2), para luego evaluar la activación del AhR y el PXR mediante la inducción de sus genes blancos canónicos, el *Cyp1a1* y el *Cyp3a11*, respectivamente. Los resultados muestran que el Zym inhibe la activación del AhR, mientras que el DENV-2 activó al PXR. Por lo que podemos concluir que algunos PAMPs son reconocidos por el AhR y el PXR provocando su activación o inhibición.

ABSTRACT

Throughout time, living organisms have interacted with different classes of molecules other than those produced by themselves, known as xenobiotics, which can cause adverse effects on the body. Throughout evolution, different proteins have specialized in recognizing these xenobiotics, now called xenosensors. All these proteins act as ligand-dependent transcription factors that bind to a wide variety of compounds and promote the expression of metabolizing enzymes that, in turn, biotransform xenobiotics into more soluble and polar compounds in order to eliminate them. Within the xenosensors, the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and the pregnane X receptor (PXR) have been recognized for their ability to not only recognize xenobiotics, but also to regulate innate and adaptive immune response in the presence of microorganisms. In the present work, we investigated whether AhR and PXR can be activated by different pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). To meet this goal, mouse peritoneal macrophages were treated with lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan (PGN), zymosan (Zym) and a dengue virus serotype 2 (DENV-2) sonicate to then evaluate their activation of AhR and PXR by induction of their canonical target genes, *Cyp1a1* and *Cyp3a11*, respectively. The results show that Zym inhibits AhR activation, while DENV-2 activated PXR. So we can conclude that some PAMPs could be recognized by AhR and PXR causing their activation or inhibition.

2. INTRODUCCIÓN

Los sistemas biológicos, desde su origen, han desarrollado una gran variedad de estrategias para sobrevivir y adaptarse a los cambios del ambiente. El éxito se apoya, de manera fundamental, en la capacidad de registrar el entorno y sus cambios para responder de manera adecuada. Para ello, a través de la evolución, han surgido una variedad asombrosa de sensores acoplados a sistemas que permiten mantener la homeostasis celular. Uno de ellos es el sistema xenosensores-enzimas metabolizadoras de xenobióticos, cuya finalidad es identificar agentes químicos que ingresan al organismo y biotransformarlos para su pronta excreción. Otro, es el constituido por los receptores de reconocimiento de patrones y la respuesta inmune innata, cuya función es identificar a microorganismos que ingresan a la célula y elucida una respuesta inmune que lleve a su eliminación.

Aunque cada uno de estos sistemas se ha especializado en la identificación de un tipo de agente externo – xenobiótico o microorganismo – no significa que carezcan de la capacidad de registrar ambas clases de agentes e iniciar una respuesta. En este trabajo se explora la posibilidad de que los xenosensores no sólo identifican compuestos químicos sino también microorganismos.

2.1. Xenobióticos

Su origen proviene de las palabras griegas “*xenos*”, que significa extraño o desconocido, y “*bios*” vida, por lo que su significado etimológico es “extraño para la vida”. Generalmente son sustancias o moléculas que pueden ser derivadas de un proceso sintético, como son los fármacos y contaminantes ambientales; o naturales, como metabolitos secundarios, toxinas o productos del metabolismo alimentario. El uso de compuestos sintéticos es de enorme valor para las sociedades humanas actuales, particularmente en industrias como la farmacéutica, petroquímica, pesticida y de plásticos, entre muchas otras (Anzenbacher & Zanger, 2012; Connell, 2018). Sin embargo, muchos de ellos se originan como derivados secundarios no deseados en procesos industriales o de la combustión de compuestos orgánicos.

Estos compuestos pueden atravesar las membranas celulares de una manera sencilla, a través de una propiedad llamada lipofilicidad, mediante diferentes vías como la cutánea, pulmonar o gastrointestinal. Para evitar su acumulación deben ser eliminados. Su excreción ocurre cuando adquieren una propiedad llamada hidrofiliicidad, que se adquiere por un proceso llamado biotransformación, y que generalmente se realiza gracias a enzimas metabolizadoras de xenobióticos (Klaassen & Amdur, 2013). Si los xenobióticos no son eliminados de la célula, se pueden provocar efectos adversos en los tejidos y órganos, como cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, neurotoxicidad e inmunotoxicidad, entre otros (Eaton & Gilbert, 2008).

2.2. Enzimas metabolizadoras de xenobióticos

La biotransformación de los xenobióticos ocurre principalmente en el hígado, pero también tiene lugar en el plasma, pulmones, tracto gastrointestinal y en la piel. Este proceso permite aumentar la polaridad y solubilidad en agua de compuestos lipofílicos, para poder ser excretados mediante la bilis o la orina. Dicha conversión

es llevada a cabo por un conjunto de enzimas que pueden ser clasificadas en cuatro grupos dependiendo de la reacción que catalizan: 1) hidrólisis, 2) reducción, 3) oxidación y 4) conjugación. Las enzimas de los grupos 1-3 realizan las reacciones conocidas como de fase 1 que se encargan principalmente de incrementar la polaridad de los xenobióticos. Las reacciones de conjugación son llamadas reacciones de fase 2, cuyos sustratos son los productos de las reacciones de fase 1. En su conjunto, estas enzimas se encargan de reducir la toxicidad de los xenobióticos (bioinactivación o detoxificación) (Figura 1) (Dancygier, 2009). Dentro de las reacciones de fase 1 las que llevan a cabo la oxidación de los xenobióticos son las más abundantes. Dentro de este grupo destacan las enzimas conocidas como citocromos P450 (CYPs) (Raunio et al., 2015).

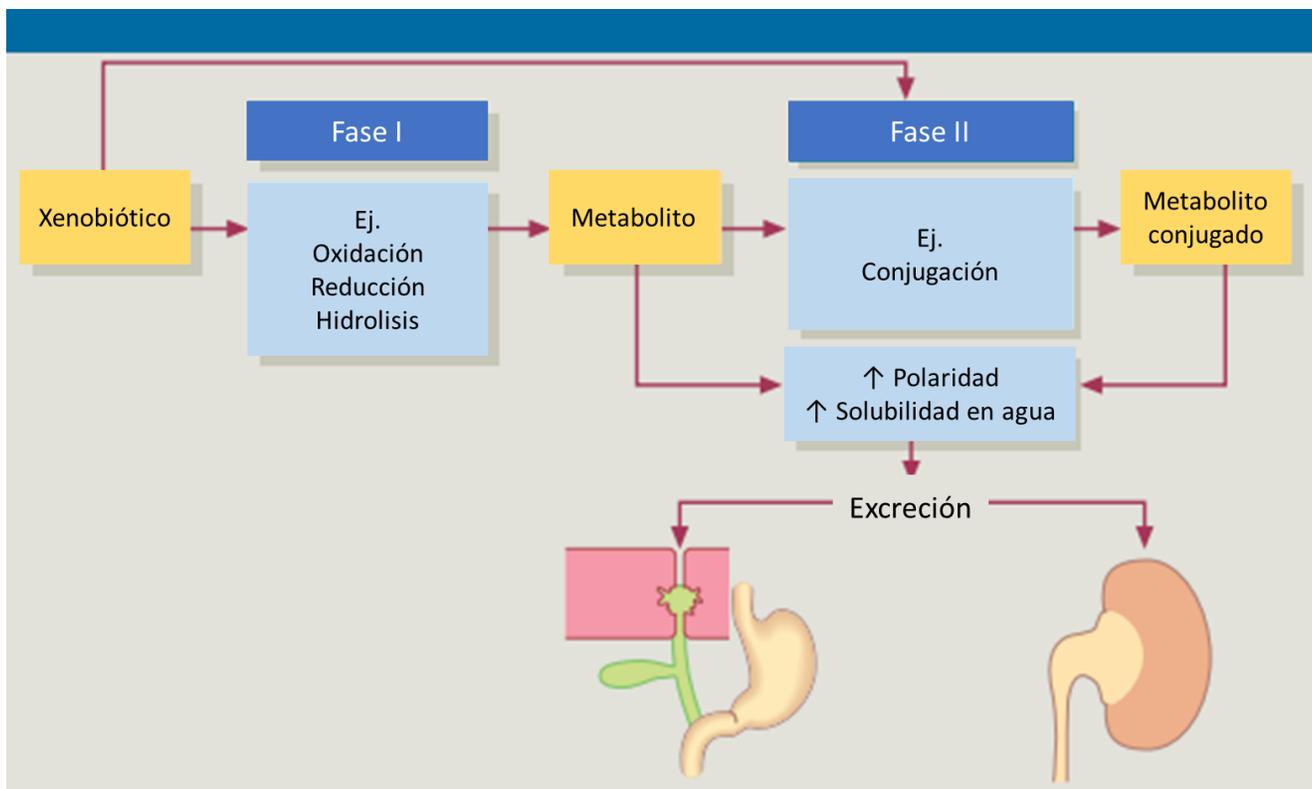


Figura 1. Biotransformación y excreción de xenobióticos. Modificada de Dancygier, 2009.

2.3. Citocromo P450

Los citocromos P450 (CYP450s) son una superfamilia de proteínas con al menos 55 genes. Su nombre se debe a que el complejo ferroso del CYP450 tiene una absorción máxima a una longitud de onda de 450 nm (pigmento 450). Se caracterizan por poseer en su pieza central un grupo hemo donde ocurre la actividad catalítica (de Montellano, 2015; Zhou et al., 2006).

Las reacciones de oxidación mediadas por el CYP450 se llevan a cabo, principalmente, en el retículo endoplásmico y consisten en la incorporación de un átomo de oxígeno al sustrato, mientras que otro es reducido a agua (Isin & Guengerich, 2007). La energía para romper la unión entre moléculas de oxígeno es otorgada por la transferencia de electrones del NAD(P)H mediada por una proteína cercana al CYP450 llamada NADPH - citocromo P450 reductasa (CPR) (Figura 2) (Im & Waskell, 2011).

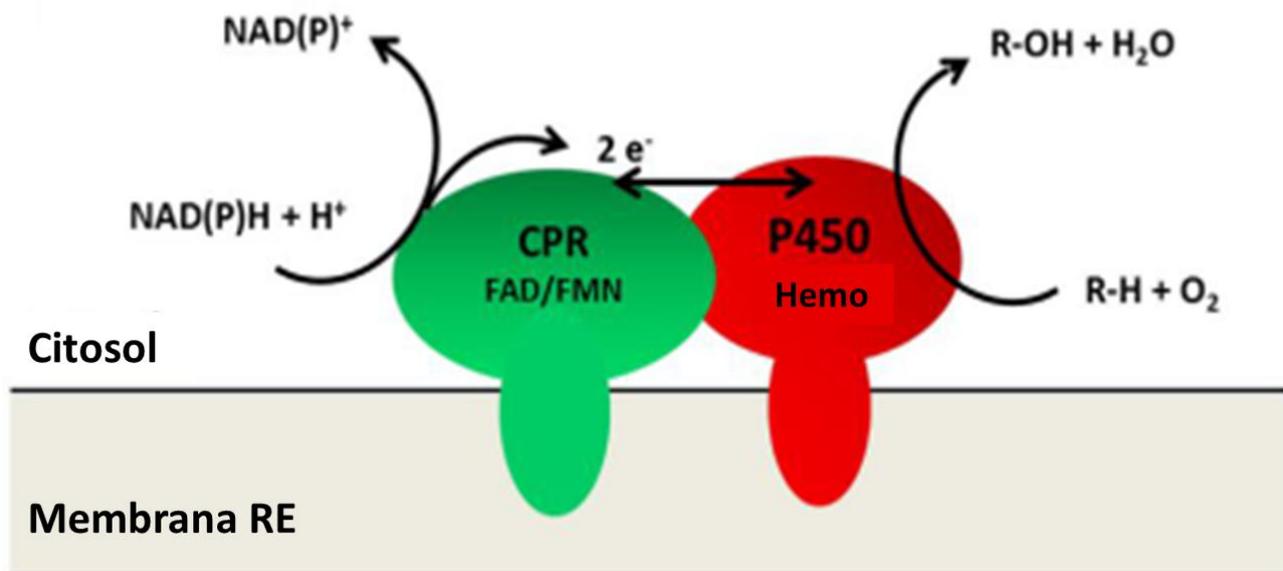


Figura 2. Mecanismo por el cual el citocromo P450 cataliza la oxidación de los xenobióticos.
Modificada de Brixius-Anderko, 2016.

Los CYP450 se encuentran en mayor proporción en el hígado e intestino, pero también, en menor medida, en otros tejidos. Su principal localización celular es en la membrana del retículo endoplásmico liso (fracción microsomal). Además de llevar a cabo la biotransformación de los xenobióticos, participan en la biosíntesis o catabolismo de hormonas esteroideas, ácidos biliares, vitaminas liposolubles como la A y D, ácidos grasos y eicosanoides, entre otros biocompuestos lipídicos (Parkinson, et al., 2019).

Mayoritariamente las familias CYP1, 2, 3 y 4, realizan la detoxificación de fármacos y xenobióticos, y son seis de sus miembros los que metabolizan aproximadamente el 90% de los fármacos, principalmente de la familia 1 a la 3: CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4 (Manikandan & Nagini, 2018).

2.4. Inducción de citocromo P450

La eliminación de xenobióticos es un proceso adaptativo que permite disminuir la exposición prolongada a agentes químicos. Esta es realizada, como se comentó en la sección anterior, por enzimas biotransformadoras de xenobióticos cuya expresión está mediada por receptores que son factores de transcripción dependientes de ligando, conocidos como xenosensores (Parkinson et al., 2019). Cuando un ligando (xenobiótico) se une a un xenosensor este último se activa y promueve la expresión de los CYP450s a nivel transcripcional (Tompkins & Wallace, 2007).

Algunos de los inductores más potentes de los CYP450, son los hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs). Dentro de estos se encuentran los derivados policlorinados de dibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs), dibenzofuranos (PCDFs), bifenilos y naftalenos, y en general compuestos altamente clorados, que son resistentes a la biotransformación, y causan una prolongada inducción de los CYP450s y otras enzimas (Pelkonen et al., 2008). Otros contaminantes ambientales con gran capacidad de inducir la expresión de los CYP450s son los pesticidas como el

DDT, entre otros. También, los medicamentos y numerosos fitoquímicos poseen la capacidad de unirse y activar a numerosos xenosensores.

Los xenosensores poseen un dominio de unión a ligando (LBD) y un dominio de unión a DNA (DBD) rico en cisteínas (Guengerich & Bartleson, 2005). Su activación y mecanismo de acción se da a través de los siguientes pasos: 1) unión de ligando (xenobiótico) al xenosensor; 2) disociación de las proteínas co-represoras; 3) internalización nuclear; 4) dimerización con co-activadores; 5) unión del heterodímero a regiones discretas del DNA, llamados elementos de respuesta (ER), localizados en la región promotora del gen blanco, y su transcripción (Parkinson et al., 2019) (Figura 3).

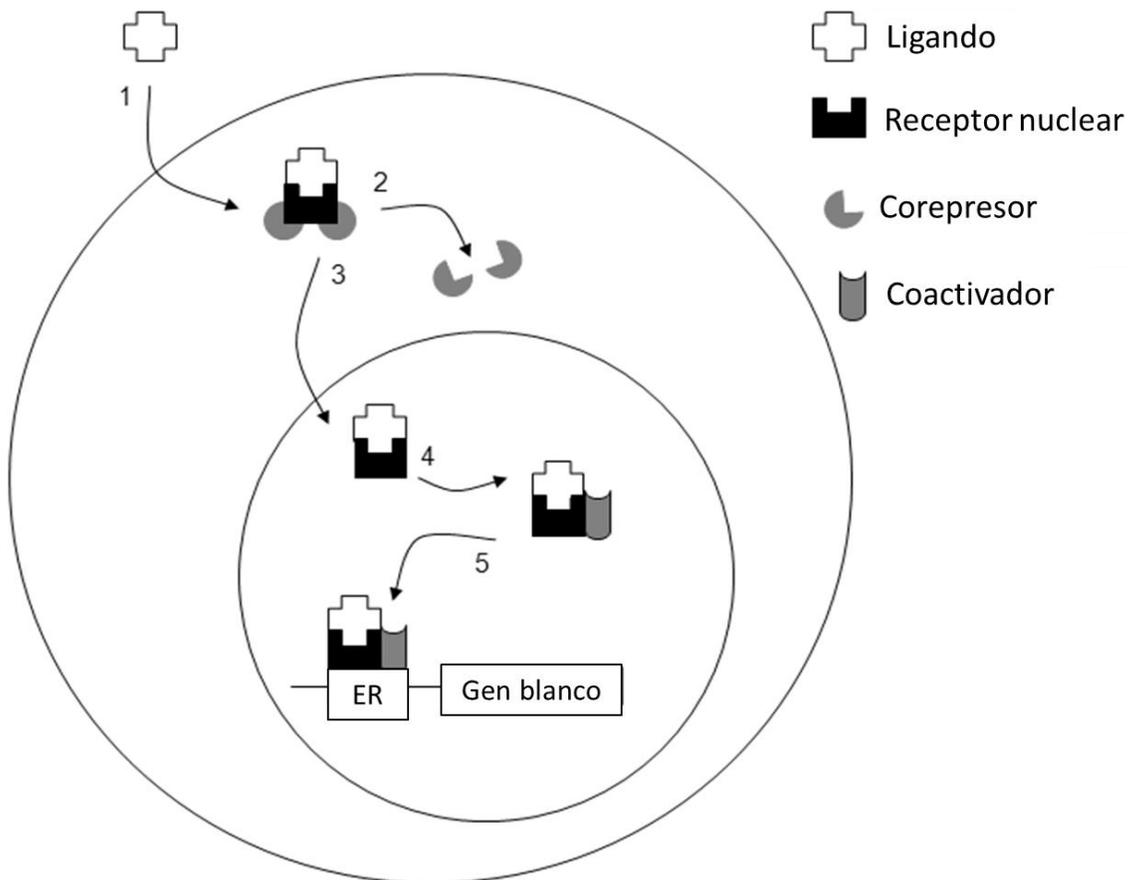


Figura 3. Mecanismo de acción general de los xenoreceptores.

Existen cuatro principales xenosensores que inducen la transcripción de la mayoría de los CYP450s que llevan a cabo más del 80% de la biotransformación. El receptor para hidrocarburos arilo (AhR), que permite principalmente la inducción de genes de la familia CYP1 como respuesta a la exposición a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Los otros tres, que pertenecen a la superfamilia de receptores esteroideos, son el receptor X para pregnano (PXR) el cual induce a la subfamilia CYP3A en respuesta a diversos químicos; el receptor constitutivo para androstano (CAR), que media la inducción de la subfamilia CYP2B en respuesta a fenobarbitales; y el receptor activado por proliferadores del peroxisoma (PPAR) y que media la inducción de la subfamilia CYP4A por diferentes ligandos (Pelkonen et al., 2008) (Tabla 1).

Tabla 1. Principales xenosensores, sus ligandos y genes blanco. Modificada de Manikandan & Nagini, 2018.

Receptor	Ligando	Proteína Dimerizadora	Elemento de respuesta al DNA	CYPs Inducidos	Otras Enzimas Inducidas
AhR	HAPs, (HAHs), fármacos, cafeína y eicosanoides	ARNT	XRE	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1	GST, UGT, QR
PXR	Esteroides naturales y sintéticos, hormonas y metabolitos esteroideos, fármacos (comestrol, rifampicina, carbamazepina, dexametasona, fenilbutazona y carotenoides), xenobióticos	RXR α	PXRE	CYP3A4	Genes de resistencia a multidrogas que codifican a la P-glicoproteína (ABCB1) Mrps, oatp2, UGT
CAR	Fenobarbital, amobarbital, secobarbital, androstanol	RXR α	PBREM	CYP2B, CYP2C8, CYP2C9	Sulfotransferasas, glucuronosiltransferasas, GST y transportadores
PPAR	Carcinógenos y proliferadores del peroxisoma, ácidos grasos y leucotrienos.	RXR α	Genes de respuesta a PPAR	CYP4A	Enzimas metabolizadoras de ácidos grasos

2.5. Receptor para hidrocarburos arilo (AhR)

El AhR es un factor de transcripción, dependiente de ligando, involucrado en la biotransformación de toxinas ambientales. Su ligando con mayor actividad y afinidad es el 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina (TCDD), pero posee otros ligandos de compuestos exógenos como los PAHs y algunos fitoquímicos como la cafeína, además de endobióticos como los compuestos derivados del metabolismo del triptófano (Quintana & Sherr, 2013).

Posee un motivo básico hélice-bucle-hélice (bHLH) en el amino terminal cuya función es permitir la unión al DNA, así como su dimerización. En este dominio también se encuentra la señal de localización nuclear y de exporte nuclear (Wagner Jr et al., 2016). Seguido del dominio bHLH se encuentra el dominio PAS (de Per – period circadian protein, Arnt – aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, Sim – single minded protein) posee dos repetidos imperfectos PAS-A y PAS-B que contienen el dominio de unión a ligando (LBD), así como el sitio de unión para la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) que mantiene al AhR en una localización citoplásmica. El extremo carboxilo terminal contiene el dominio de activación transcripcional (Wagner Jr et al. 2016), que es una región rica en glutaminas (Fukunaga et al., 1995).

En el citoplasma, el AhR se encuentra unido a Ara9, c-SRC y HSP90, proteínas que lo mantienen en dicho compartimiento celular. Al unirse a su ligando, se libera c-SRC el cual realiza la fosforilación en residuos de tirosina (tirosin cinasa), de proteínas importantes en diferentes vías de señalización celular. Por otro lado, el AhR actúa a través de 2 vías: la no genómica en la que su función es de E3 ligasa, promoviendo la ubiquitinación y degradación proteosomal de varias proteínas; y la genómica en la que actúa como factor de transcripción. Se transloca al núcleo, se une a coactivadores y controla la transcripción de diferentes genes (Figura 4) (Kawajiri & Fujii-KuriYama, 2017).

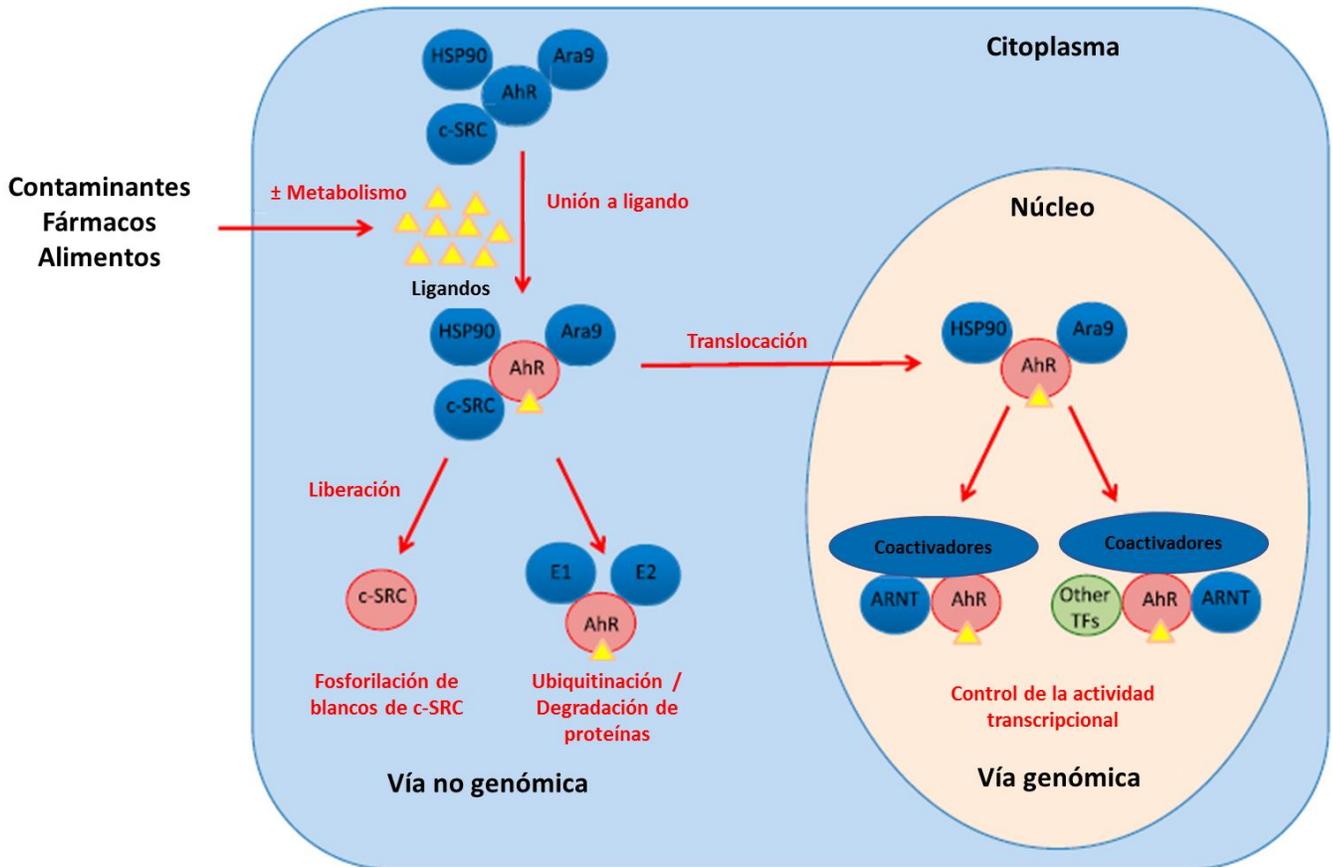


Figura 4. Vías de señalización del AhR. Modificada de Quintana & Sherr, 2013.

Además de su papel como xenosensor, existe evidencia que sitúa al AhR en otros procesos celulares. Particularmente, participa de manera relevante en el desarrollo y función de la respuesta inmune innata y adaptativa. En el sistema inmune innato, principalmente en células presentadoras de antígenos como los macrófagos (MΦ's) y CD, suprime la expresión de citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL12 y TNF α). Lo hace promoviendo la ubiquitinación de NF- κ B y su consecuente degradación mediada por el proteosoma 26S (Domínguez-Acosta et al., 2018). En la respuesta inmune adaptativa, el AhR provoca, a través de la inducción de FOXP3, la diferenciación de los linfocitos T nativos CD4⁺ a células Th17 y T_{reg} (Quintana et al., 2008).

2.6. Receptor X para pregnano (PXR)

El PXR también es un factor de transcripción dependiente de ligando que regula la expresión de enzimas tanto de fase I como II, así como de transportadores de fármacos fundamentales en la eliminación de los xenobióticos y endobióticos. En los seres humanos, es el principal regulador de la inducción del CYP3A4, el cual participa en el metabolismo de aproximadamente 50% de los medicamentos de uso actual. Entre los principales ligandos del PXR se encuentran fármacos como antibióticos (rifampicina), antiinflamatorios (dexametasona), antigluocorticoides (pregnelonona 16 α -carbonitrilo), así como compuestos derivados del metabolismo esteroideo. Su expresión es más abundante en hígado e intestino, aunque también se expresa en menor medida en otros órganos (Pavek, 2016).

La estructura proteica del PXR posee un DBD en el amino terminal con dos dedos de zinc. Esta región se une al promotor del gen blanco al cual se le conoce como el módulo potenciador de respuesta a xenobióticos (XREM). En el carboxilo terminal se encuentra el LBD, dominios de dimerización, de transactivación, y la región central H (hinge), que es un dominio flexible que conecta al DBD con LBD lo que permite una multiconformación para unirse a diferentes ligandos (Oladimeji & Chen, 2018).

La asociación de PXR con HSP90 y con la proteína de retención citoplásmica de CAR (CCRP) lo mantiene en el citosol. Al unirse a un ligando se disocia y se transloca al núcleo, donde forma un heterodímero con el receptor X para retinoides (RXR), llevándose a cabo el reclutamiento de la maquinaria para la transcripción de sus genes blanco (Figura 5) (Squires et al., 2004).

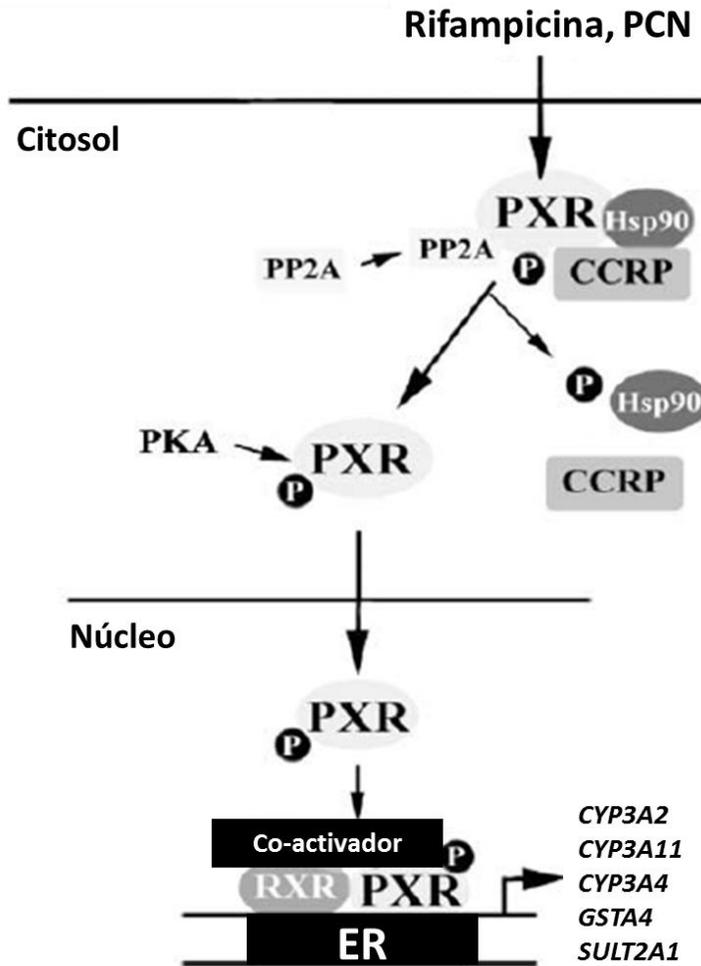


Figura 5. Vía de señalización del PXR. Modificada de Squires, et al. 2004.

Se ha reportado que el PXR no solo forma heterodímeros con el RXR, sino que puede formar homodímeros PXR-PXR. Debido a esta versatilidad puede regular la transcripción de una gran variedad de genes y participar en varios mecanismos celulares (Oladimeji & Chen, 2018). El PXR tiene un efecto dual en la regulación de la proliferación celular. Por un lado, inhibe la proliferación celular bloqueando la transición G2-M mediante la inhibición de la expresión de ciclinas, y por el otro, puede potenciar la proliferación inhibiendo genes supresores del ciclo celular de la transición G1-S. Aún se desconoce el cómo se determina entre una vía u otra (Shizu et al., 2016). Además de controlar la proliferación celular, también tiene un

efecto en la motilidad. Su activación puede potenciar la migración, especialmente en células de cáncer, en donde se aprecia una sobreactivación del PXR lo que resulta en una activación de algunas vías de señalización que promueven la migración de este tipo de células (Qiao et al., 2013). Además, su activación regula positivamente la expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 y Bcl-xL) y negativamente proteínas proapoptóticas (p53) (Zucchini et al., 2005).

En cuanto a la respuesta inmune, como el AhR, el PXR tiene una función antiinflamatoria. Su activación en el hígado e intestino inhibe la acción de NF- κ B y la consecuente expresión de citocinas inflamatorias (Zhou et al., 2006).

2.7. Sistema inmune innato

El sistema inmune es un complejo de células y moléculas encargadas de desencadenar una respuesta colectiva y coordinada frente a sustancias extrañas como microorganismos y macromoléculas infecciosas. Esta defensa está mediada por reacciones tempranas -inmunidad innata- y respuestas tardías -inmunidad adaptativa- (Abbas et al., 2017).

La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa durante una infección, dando lugar a respuestas rápidas para evitar la patogenicidad. Esta es llevada a cabo por células fagocíticas y APCs, como granulocitos, DCs y M Φ 's.

La respuesta adaptativa se encarga de la eliminación de los patógenos en fases tardías. También genera una memoria inmunológica contra subsecuentes infecciones a través de un amplio repertorio de arreglos clonales en los receptores de los linfocitos, que son las células más importantes de este tipo de respuesta. (Medzhitov & Janeway Jr, 2000).

La respuesta inmune innata ha evolucionado al punto de reconocer tanto estructuras altamente conservadas en los microorganismos conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como productos de desecho del metabolismo celular, llamados patrones moleculares asociados a

daño (DAMPs). Dicho reconocimiento es realizado a través de un número limitado de receptores, los cuales son conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Los PAMPs son moléculas muy importantes en la supervivencia y estructura de patógenos como virus, bacterias (Gram positivas y negativas), hongos y parásitos. Y sin embargo, estos microorganismos son reconocidos por las células a través de sus PAMPs lo que resulta en una respuesta inmune que evita la infección y colonización de las células, tejidos y órganos evitando un desequilibrio en el funcionamiento fisiológico del organismo (Mogensen, 2009).

2.8. Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)

Los PRRs son de importancia vital para los organismos y se les puede clasificar como membranales y citoplásmicos. Son activados por un ligando (PAMP) lo que genera la activación del complemento, fagocitosis, autofagia y activación inmune mediante vías de señalización, moléculas adaptadoras, cinasas y factores de transcripción. Lo anterior resulta en la regulación de la expresión génica de diferentes moléculas importantes en la respuesta inmune, como las citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular e inmunoreceptores que crean un vínculo directo con la respuesta inmune adaptativa (Figura 6) (Akira et al., 2006).

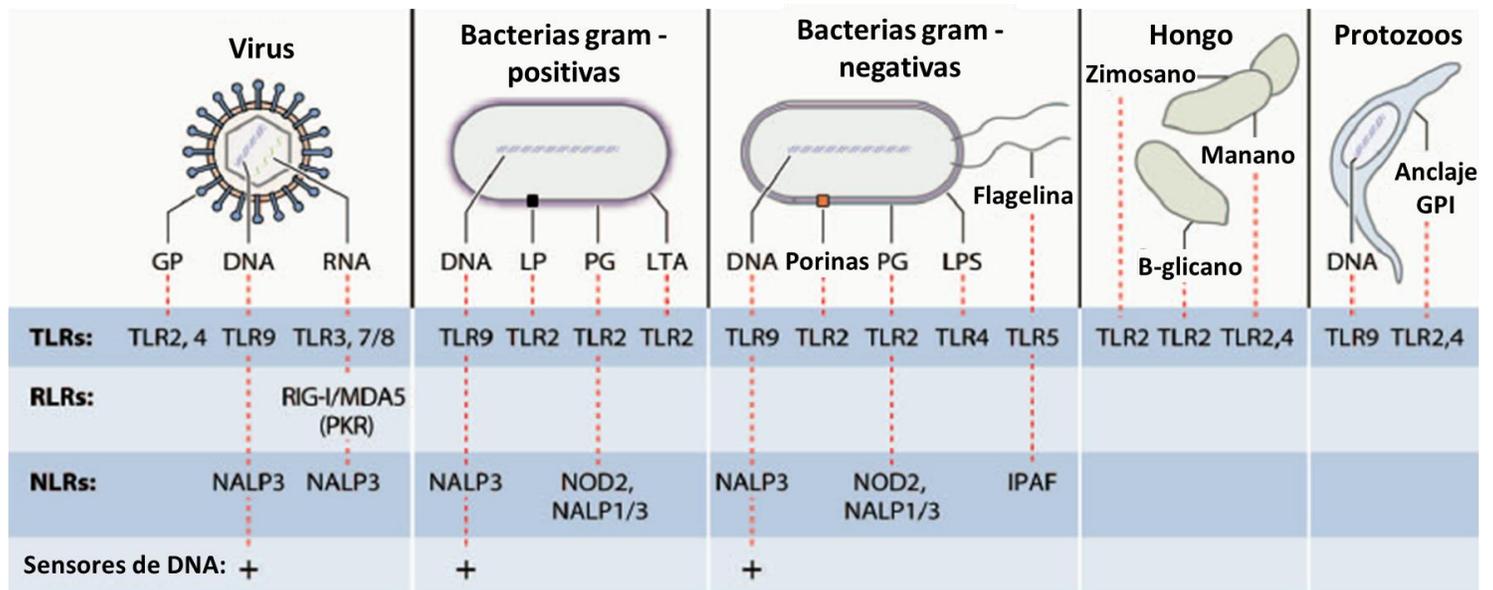


Figura 6. Principales PAMPs y sus correspondientes PRRs. Modificada de Mogensen, 2009.

Existen 4 diferentes familias de PRRs:

1) Los receptores tipo Toll o TLR son glicoproteínas integrales con un dominio extracelular el cual se une al ligando y que consiste en repetidos ricos en leucina (LRR) y un dominio intracelular homólogo a TIR (Toll – interleucina 1). Su unión al ligando permite su oligomerización, iniciando la transducción de señales. Los hay citoplásmicos e intracelulares y son los más estudiados ya que reconocen un amplio número de PAMPs de diferentes patógenos debido a su capacidad de homo y heterodimerización (O'Neill & Bowie, 2007).

2) Los receptores tipo RIG-I (gen inducible por ácido retinoico) o RLR inician la vía de señalización CARD-CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) y generalmente median la respuesta antiviral mediante IFN-I. Poseen un dominio de helicasa (dominio central con actividad ATPasa) y un dominio de unión a RNA, (Yoneyama et al., 2004).

3) El receptor tipo NOD (dominio de oligomerización de unión a nucleótidos) o NLR contiene un dominio central NOD que induce la oligomerización, un C-terminal (LRR) que identifica al ligando y una región N-terminal que inicia la señalización celular, generando la expresión de citocinas proinflamatorias y la activación de caspasas induciendo la formación del inflamosoma. Además de los PAMPs, los NLR también son activados por DAMPs (Kanneganti et al., 2007).

4) Sensores de DNA, entre los más comunes son el DAI (activador de factores regulatorios de IFN, dependientes de DNA) que se caracteriza por aumentar la expresión de IFN-I y el AIM2 (Ausente en melanoma 2) que estimula la maduración y señalización de la pro-IL-1 β . En su mayoría poseen dominios de unión a DNA (DBD), y son responsables de identificar el DNA de diferentes microorganismos (Takaoka et al., 2007).

3. ANTECEDENTES

Los xenosensores han sido estudiados, principalmente, como parte del sistema de detoxificación y excreción de xenobióticos debido a su papel en la inducción de enzimas metabolizadores de xenobióticos. Sin embargo, se ha sugerido que estos sistemas de detoxificación participan directa o indirectamente en actividades inflamatorias mediada por patógenos (Moreau, et al., 2007). En el 2014, se reportó que las fenazinas, las cuales son metabolitos secundarios de algunas bacterias y que participan en la patogenicidad, tienen la capacidad de unirse directamente al AhR e inducir la expresión de sus genes blanco como el *CYP1A1* (Moura-Alves et al., 2014).

En otro estudio realizado por Hubbard et al. en el 2015, se demostró que los indoles, productos derivados del metabolismo de la microbiota que participan en la formación de biofilms, virulencia y resistencia a antibióticos, provocan la activación del AhR en la línea celular Caco-2 (Hubbard et al., 2015).

En cuanto al PXR y posibles ligandos derivados de microorganismos existe menos información. Se ha reportado que, en MΦ's algunos lípidos de *Mycobacterium tuberculosis* activan a este xenosensor (Bhagyaraj et al., 2016).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente, el receptor para hidrocarburos arilo (AhR) ha sido propuesto como un receptor de reconocimiento de patrones (PRR). Se ha observado que los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como las fenanzinas, correspondientes a bacterias, activan al AhR lo que resulta en una regulación de la respuesta inmune. Sin embargo, aún se desconoce si otros PAMPs del repertorio patogénico pueden activar al AhR. Además de este último, existen otros xenosensores que pudieran ser considerados como PRRs. En particular, el receptor X para pregnano (PXR) que como el AhR también puede regular la respuesta inmune, por lo que pudiera actuar como un PRR.

5. HIPÓTESIS

La exposición a lipopolisacárido (LPS), péptidoglicano (PGN), zimosano (Zym) y virus del dengue serotipo 2 (DENV-2) modificará la actividad del AhR y PXR de MΦ's peritoneales de ratón.

6. OBJETIVO GENERAL

Analizar si la exposición a LPS, PGN, Zym y DENV-2 modifica la actividad del AhR y PXR en MΦ's peritoneales de ratón.

6.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si la exposición a diversos PAMPs modifica la transcripción de genes blancos del AhR y el PXR.
- Evaluar si la exposición a diversos PAMPs promueve la translocación nuclear del AhR y el PXR.

7. MÉTODOS

7.1. Obtención de macrófagos peritoneales

Se obtuvieron MΦ's peritoneales de ratones de la cepa C57BL/6, machos, de 8 - 13 semanas de edad. Se sacrificaron, de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999, por dislocación cervical. Posteriormente, se realizó una incisión cutánea para exponer el peritoneo donde se inyectaron, con una jeringa 22G, 10 mL de solución buffer de fosfatos 1X (PBS) frío. Se procedió a realizar un masaje por 10 min, se obtuvo el PBS dentro del peritoneo y se colocó en un tubo de recolección, realizándose así un "pull" de MΦ's peritoneales de todos los animales. La muestra se centrifugó a 16773 g por 10 min a 4° C, se retiró el sobrenadante, y se diluyó el botón celular en 1 mL de medio RPMI-1640 (Thermofisher MA, USA) suplementado. Del resuspendido celular se tomó una muestra de 10 µL, se diluyó en 190 µL de azul tripano y se determinó el número y la viabilidad celular por el método de exclusión de azul de tripano en un microscopio invertido con la ayuda de una cámara de Neubauer.

7.2. Cultivo celular

La concentración celular utilizada se indica para cada tipo de experimento que se realizó. Los cultivos se llevaron a cabo en 1 mL de medio RPMI suplementado en una caja de Petri de 3.5 cm². Posteriormente, los MΦ's se incubaron al menos 3 h para permitir su adherencia a la superficie de la caja. Transcurrido el tiempo de adhesión, para eliminar eritrocitos y células no adheridas, se realizó un lavado con PBS 1X, y se adicionó medio RPMI suplementado con el tratamiento correspondiente, las condiciones de estándares de cultivo fueron 5% CO₂ y temperatura de 37 °C.

7.3. Tratamientos

Los tratamientos utilizados fueron los siguientes: 1) TCDD (Sigma-Aldrich MO, USA), ligando prototipo del AhR y 2) 5-pregnano-3 β -ol-20-ona-16 α -carbonitrilo (PCN) (Sigma-Aldrich MO, USA), ligando prototipo del PXR. En un inicio, se utilizaron 1, 10, 20 y 50 nM de TCDD y 10, 20, 50 y 100 μ M de PCN para obtener las curvas de citotoxicidad en los M Φ 's peritoneales de ratón y determinar la concentración de cada uno de estos compuestos para los experimentos posteriores. Como vehículo de estos compuestos se utilizó DMSO 0.008%.

Por otra parte, los PAMPs utilizados fueron los siguientes: 1) lipopolisacárido (LPS) (Sigma-Aldrich MO, USA) de *Escherichia coli*, como representante de bacterias Gram negativas. Se empleó en una concentración de 10 μ g/mL por 24 h; 2) péptidoglicano (PGN) (InvivoGen CA, USA) de *Staphylococcus aureus* como representante de bacterias Gram positivas. Se utilizó a una concentración de 10 μ g/mL por 48 h; 3) zimosano (Zym) (InvivoGen CA, USA) de *Saccharomyces cerevisiae* como representante del grupo de hongos. Se empleó a una concentración de 10 μ g/mL por 48 h; y 4) Un sonicado del virus del dengue serotipo 2 (DENV-2) agente infeccioso, perteneciente al grupo de los virus, el cual fue donado gracias al grupo de trabajo del Dr. Leopoldo Flores. Este fue previamente inactivado y fue utilizado a una concentración de 5 unidades formadoras de placa (UFP)/mL por 72 horas. Como vehículo de estos tratamientos fue empleado medio RPMI.

7.4. Ensayo de citotoxicidad por MTT

Se sembraron, en una placa de 98 pozos, 1×10^6 M Φ 's/mL y se incubaron como se describe en la sección 7.2. Los tratamientos empleados fueron medio RPMI como control, DMSO 0.008% como vehículo, TCDD (1, 10, 20 y 50 nM) y PCN (10, 20, 50 y 100 μ M) por 24 h. Se preparó MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro) diluido en PBS 1X a una concentración final de 5 mg/mL y se filtró con una membrana de 0.22 μ m. Tres horas antes de finalizar el tratamiento de 24 h, se

añadió a los cultivos 50 μ L de la solución de MTT. Finalizado el tratamiento, se retiró el medio y se dejó secar por 5 min. Se diluyeron los cristales formados con DMSO para leerse en un Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific MA, USA) a una longitud de onda de 590 nm.

7.5. Extracción de RNA

Finalizados los tratamientos, se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS 1X, se colocó la caja Petri en hielo, y se extrajo el RNA mediante el uso del kit RNeasy® (Quiagen DE-NW, GER). En este procedimiento las células son lisadas y homogenizadas, posteriormente se añadió etanol 70% y se centrifugó en columnas RNeasy mini-spin a 12000 rpm por 15 s, se lavaron con buffer de lavado, diluido 1:4 con etanol absoluto, y se centrifugaron en las mismas condiciones. El RNA se diluyó en 30 μ L de agua libre de RNasa. Posteriormente, se determinó la concentración del RNA en un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific MA, USA). Para verificar la integridad del RNA, en un gel de agarosa al 1% se cargaron 2 μ L por pozo y se corrió a 100 V por 30 min. Terminado el tiempo se visualizaron las bandas en un transiluminador Gel Doc™ XR+ Imager (Bio-Rad CA, USA), donde se procedió a tomar un registro fotográfico.

7.6. PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR)

Se obtuvo cDNA a partir de la cadena molde de RNA mediante una transcriptasa reversa (Superscript III, Thermo Fisher Scientific MA, USA). Se partió de una concentración de 500 ng de RNA y mediante un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems CA, USA), se calentó la muestra a 65 °C por 5 min, se incubó en hielo por 1 min, se añadió 0.4 μ L por muestra de transcriptasa reversa y se incubó a 25 °C por 5 min a temperatura ambiente (TA). Se realizó la retrotranscripción a 65 °C por 40 min, se inactivó la reacción a 70 °C por 15 min y se guardaron las muestras a 4 °C.

Después de obtener el cDNA, se realizó el qPCR mediante sondas TaqMan™ acopladas al fluoróforo reportero FAM, correspondientes al gen de interés a amplificar. Para el *Cyp1a1* se utilizó 0.2 µL de la sonda ID: Mm00487218_m1 (Thermo Fisher Scientific MA, USA) y para el *Cyp3a11* la sonda ID: Mm00731567_m1 (Thermo Fisher Scientific MA, USA). Como gen endógeno se utilizó la sonda para la unidad ribosomal 18s ID: Mm00507222_s1 (Thermo Fisher Scientific MA, USA). Se colocaron 2 µL de cDNA por pozo en una placa de 48 pozos, y 13 µL de una mezcla de la sonda del gen de interés con TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific MA, USA), la cual contiene la DNA polimerasa, posteriormente se leyó en un StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystem CA, USA). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de incubación a 50 °C por 2 min, un ciclo de activación de la enzima (DNA polimerasa) a 45 °C por 10 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s seguido de la alineación y extensión de la síntesis del DNA a 60 °C por 1 min. Terminado la qPCR se determinó la expresión relativa del gen de interés con respecto al gen endógeno y a un tratamiento basal, mediante el método de Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$) (Life technologies, 2014).

7.7. Inmunofluorescencia

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia, se sembraron 5×10^5 MΦ's/mL sobre un cubreobjetos dentro de una caja Petri de 3.5 cm². Se adicionó el respectivo tratamiento y se ajustó a un volumen final de 1.5 mL con medio RPMI suplementado. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se retiró el medio, se realizó un lavado con PBS 1X y se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 30 min a TA. Después se realizaron 2 lavados con PBS 1X, se permeabilizaron las células con tritón X-100 al 0.05% enfriado a 4 °C por 5 min a TA, se realizó un lavado y se procedió a bloquear uniones inespecíficas del anticuerpo con el medio de bloqueo (BSA 1%, 22.52 mg/mL de glicina diluida en PBS 1X al 0.1% de tween 20) por 30 min. Posteriormente, se eliminó la solución

de bloqueo y sin realizar ningún lavado se colocó el anticuerpo primario para el AhR ab84833 (Abcam CAM, UK) a una dilución de 1:150, y para el PXR bs-2334R (Bioss antibodies MA, USA) a una dilución de 1:150, y se incubó toda la noche a 4 °C. Finalizado el tiempo de incubación, se llevaron a cabo 3 lavados con PBS-T 0.1% por 5 min c/u, se añadió el anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor® 488 ab150077 (Abcam CAM, UK) a una dilución de 1:1000, y se incubó por 1 h a TA en completa oscuridad. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-T 0.1% por 5 min c/u. Y se agregó rodamina-faloidina R415 (Thermo Fisher Scientific MA, USA), a una dilución 1:20 por 15 min a TA, protegiendo las muestras de la luz. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X por 3 min c/u, se montó el cubreobjetos en un portaobjetos con 5 µL de vectashield con DAPI H-1200-10 (Vector Laboratories CA, USA), y se procedió a tomar fotografías, mediante un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems DE-HE, GER).

7.8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizaron las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas en el efecto de los diferentes tratamientos y sus controles. Se consideró una * $P < 0.05$ como significativa.

8. RESULTADOS

8.1. El TCDD no disminuye la viabilidad celular de los macrófagos peritoneales de ratón.

En la figura 7 se puede apreciar que la exposición a 1, 10, 20 y 50 nM de TCDD, a las 24 h, no modificó significativamente la viabilidad celular de los M ϕ 's peritoneales de ratón. De hecho, la actividad mitocondrial se mantuvo igual o por arriba cuando se compara con el vehículo (DMSO 0.008 %) o con el control sin vehículo (medio RPMI). Estos datos indican que cualquiera de estas concentraciones puede ser utilizada para evaluar la activación, mediada por el TCDD, del AhR en M ϕ 's peritoneales de ratón. La concentración que se decidió utilizar para posteriores experimentos fue la de 10 nM, ya que esta es la que más frecuentemente se utiliza en ensayos *in vitro*.

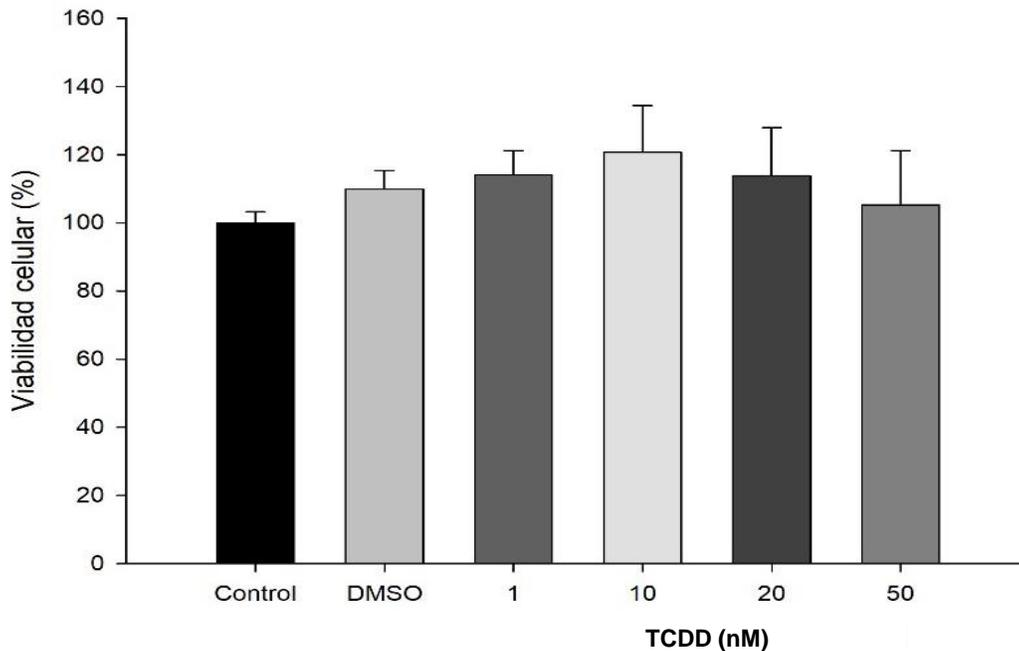


Figura 7. Efecto del TCDD sobre la viabilidad celular de M ϕ 's peritoneales de ratón. ⁶ 1×10^6 M ϕ 's fueron tratados con TCDD a las concentraciones señaladas. 24 h después se determinó la viabilidad celular mediante el uso de MTT. DMSO (0.008%), control (medio RPMI). Cada barra representa el promedio de 3 ensayos individuales \pm D.S.

8.2. El PCN no disminuye la viabilidad celular de los macrófagos peritoneales de ratón

Se trataron MΦ's peritoneales de ratón con PCN, ligando agonista del PXR, a las concentraciones de 10, 20, 50 y 100 μM a un tiempo de exposición de 24 h. Los resultados señalan que ninguna de las concentraciones empleadas altera la viabilidad celular y como en el caso del TCDD, ésta se mantuvo igual o por arriba cuando se compara con el vehículo (DMSO 0.008 %) o con el control (medio RPMI) (Figura 8). Se concluye de estos ensayos que el PCN no posee efecto citotóxico sobre las células y puede ser empleado para activar al PXR. La concentración que se decidió utilizar a partir de estos resultados fue la de 50 μM , ya que es la más comúnmente utilizada en diversos tipos celulares.

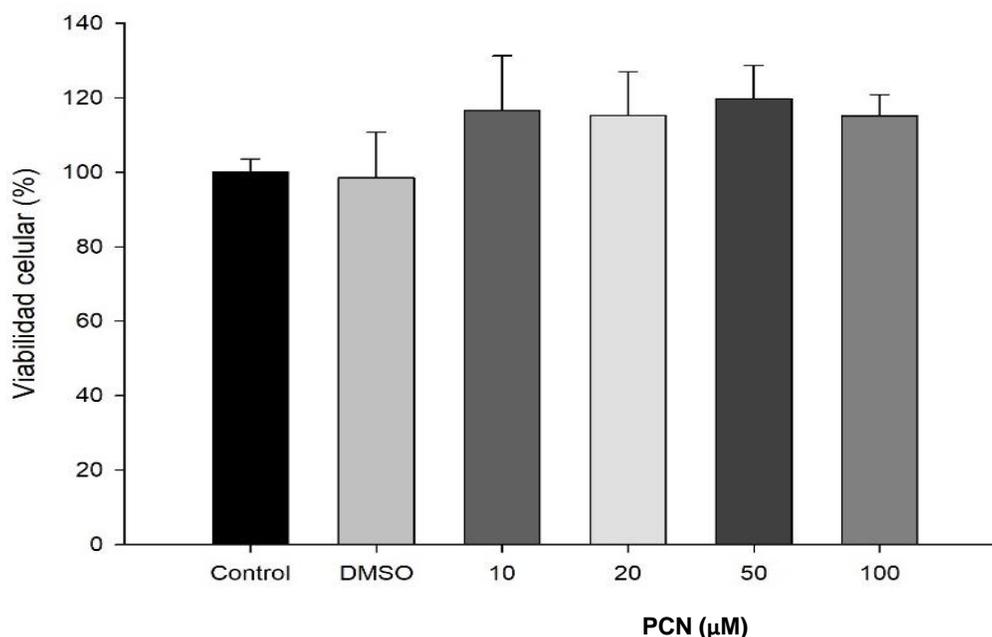


Figura 8. Efecto del PCN sobre la viabilidad celular de M ϕ 's peritoneales de ratón. 1×10^6 M ϕ 's fueron tratados con PCN a las concentraciones señaladas. 24 h después se determinó la viabilidad celular mediante el uso de MTT. DMSO (0.008%), control (medio RPMI). Cada barra representa el promedio de 3 ensayos individuales \pm D.S.

8.3. El TCDD induce la expresión del *Cyp1a1* en macrófagos peritoneales de ratón

Para evaluar la capacidad del TCDD de activar al AhR, se determinó la expresión de su gen blanco canónico, el citocromo P450 1a1 (*Cyp1a1*), en MΦ's peritoneales de ratón. Los resultados muestran que, a las 4 y 8 h, comparado con el vehículo (DMSO 0.008%) el tratamiento con TCDD activa al AhR, ya que a las 4 y 8 h se observa una inducción del transcrito del *Cyp1a1* de 60 y 275 veces, respectivamente (Figura 9). De lo anterior, se concluye que el TCDD activa al AhR en los MΦ's peritoneales de ratón. Considerando estos datos, se decidió evaluar el efecto de los diferentes PAMPs sobre la expresión del *Cyp1a1*.

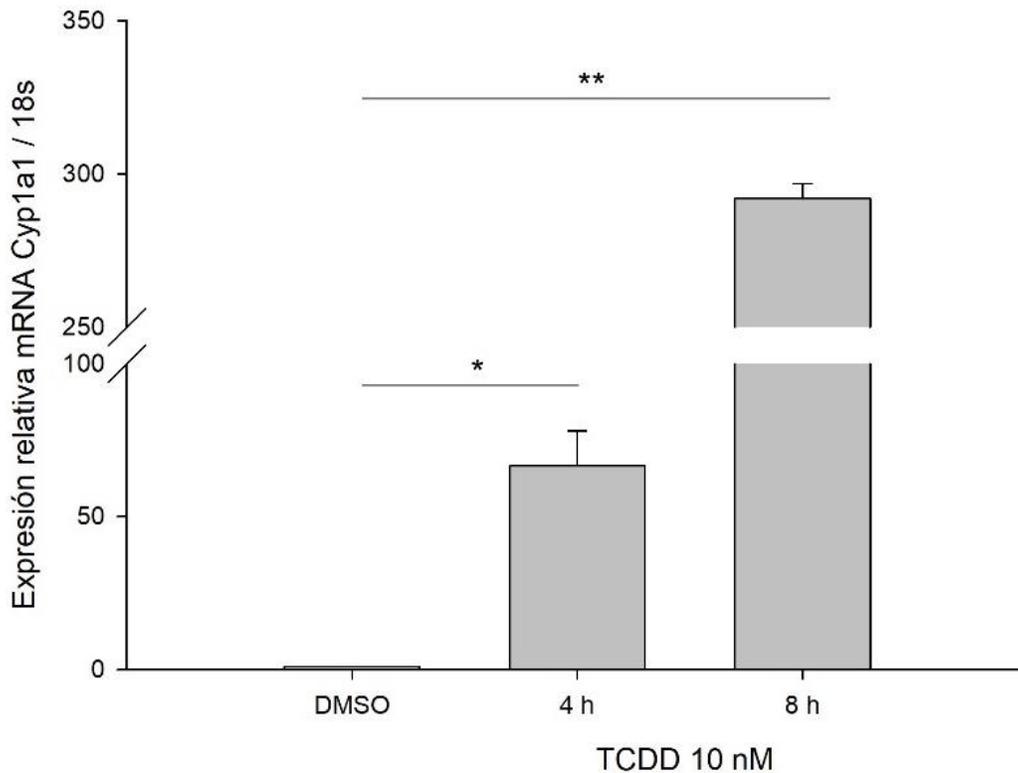


Figura 9. El TCDD induce la expresión de *Cyp1a1* en MΦ's peritoneales de ratón. 2.5×10^6 MΦ's peritoneales se trataron con 10 nM de TCDD a los tiempos indicados. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se obtuvo el RNA y se evaluaron los niveles del transcrito del *Cyp1a1*. Vehículo (DMSO 0.008%). Cada barra representa el promedio de 3 ensayos individuales \pm D.S. ANOVA * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

8.4. El PCN induce la expresión del *Cyp3a11* en macrófagos peritoneales de ratón

De manera similar al AhR, se evaluó si el PXR es capaz de ser activado, en MΦ's peritoneales de ratón, por el PCN mediante la expresión de uno de sus genes blanco, el citocromo P450 3a11 (*Cyp3a11*). Los resultados indican que a las 2, 4 y 8 h, comparado con el vehículo (DMSO 0.008%), el tratamiento con PCN sólo activó al PXR a las 8 h, en donde se observa una inducción del transcrito del *Cyp3a11* de 2 veces (Figura 10). De lo anterior, se concluye que el PCN activa al PXR en los MΦ's peritoneales de ratón. Considerando estos datos, se decidió evaluar el efecto de los diferentes PAMPs sobre la expresión del *Cyp3a11*.

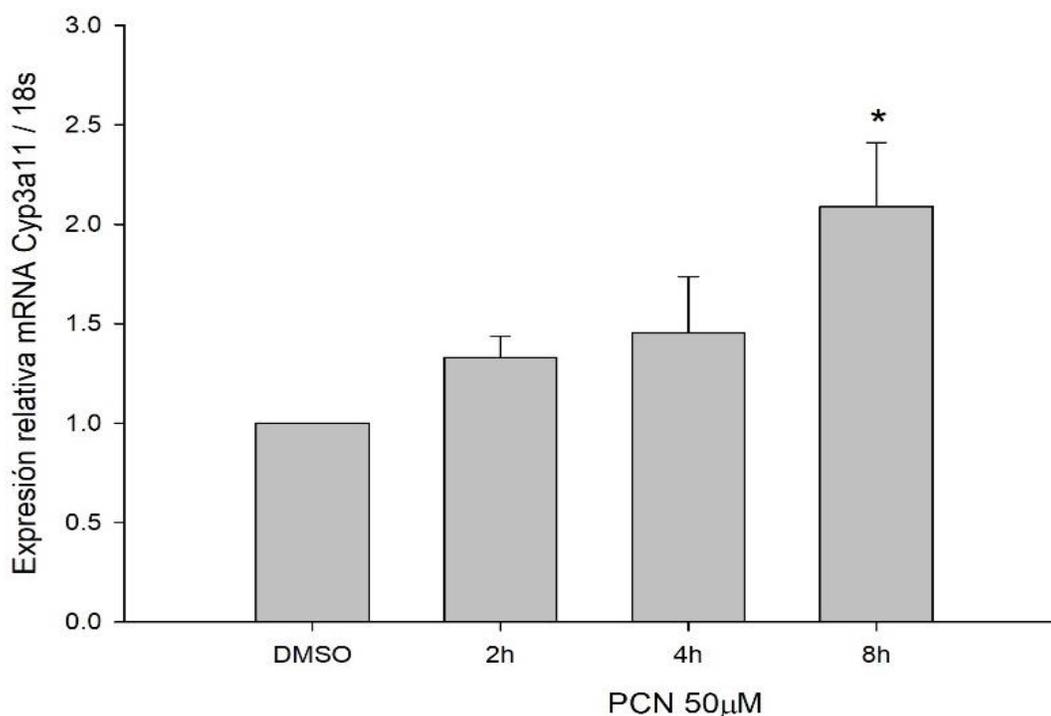


Figura 10. El PCN induce la expresión de *Cyp3a11* en MΦ's peritoneales de ratón. 2.5×10^6 MΦ peritoneales se trataron con $50 \mu\text{M}$ de PCN a los tiempos indicados. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se obtuvo el RNA y se evaluaron los niveles del transcrito del *Cyp3a11*. Vehículo (DMSO 0.008%). Cada barra representa el promedio de 3 ensayos individuales \pm D.S. ANOVA * $P < 0.05$.

8.5. Efecto de los PAMPs sobre la expresión del *Cyp1a1*

Se procedió a determinar si los PAMPs son capaces de modificar la activación de del AhR. Para ello se evaluó la expresión de *Cyp1a1* bajo los tratamientos con LPS, PGN, Zimosano y DENV-2. Como se observa en la figura 11, de los 4 PAMPs utilizados, sólo el zimosano tiene un efecto significativo sobre los niveles del transcrito del *Cyp1a1*, el cual se manifiesta como una reducción de aproximadamente el 50% respecto a los controles (DMSO y medio RPMI). Como era de esperarse, el tratamiento con TCDD indujo la expresión del *Cyp1a1* en más de 300 veces.

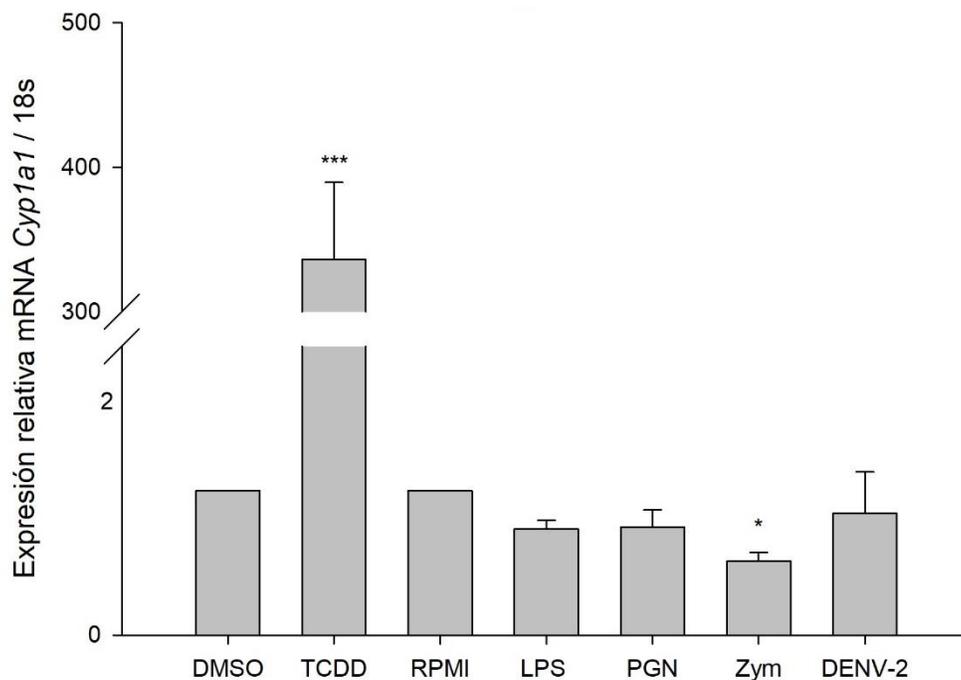


Figura 11. El zimosano disminuye la expresión del *Cyp1a1* en Mφ peritoneales de ratón. 2.5×10^6 Mφ peritoneales se trataron con 10 nM de TCDD, 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, PGN, Zimosano y 5 UFP/mL de DENV-2 a los tiempos indicados en la sección 7.3. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se obtuvo el RNA y se evaluaron los niveles del transcrito del *Cyp1a1*. Vehículos (DMSO 0.008%, medio RPMI). Cada barra representa el promedio de 3 ensayos individuales \pm D.S. ANOVA * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

8.6. Efecto de los PAMPs sobre la expresión del *Cyp3a11*

También se determinó si los PAMPs son capaces de modificar la activación del PXR. Para ello se evaluó la expresión de *Cyp3a11* posterior a los tratamientos con LPS, PGN, Zimosano y DENV-2. La figura 12 contiene los datos que muestran que, de los 4 PAMPs utilizados, sólo el DENV-2 tiene un efecto significativo sobre los niveles del transcrito del *Cyp3a11*, el cual se muestra como una inducción de aproximadamente 4 veces respecto a los controles (DMSO y medio RPMI) y del doble con respecto al tratamiento con PCN, el cual fue de 2 veces respecto a los controles.

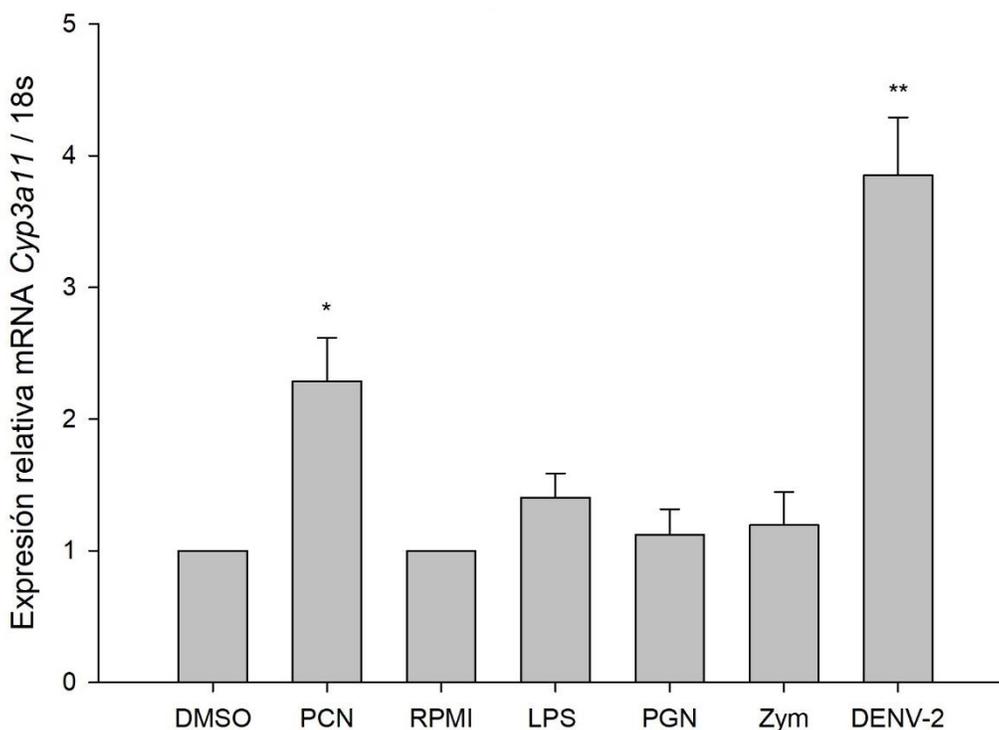


Figura 12. El DENV-2 induce la expresión del *Cyp3a11* en *Mφ*'s peritoneales de ratón. 2.5×10^6 *Mφ*'s peritoneales se trataron con 50 μ M de PCN, 10 μ g/ml de LPS, PGN, Zimosano y 5 UFP/mL de DENV-2 a los tiempos indicados en la sección 7.3. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se obtuvo el RNA y se evaluaron los niveles del transcrito del *Cyp3a11*. Vehículos (DMSO 0.008%, medio RPMI). Cada barra representa el promedio de 3 ensayos individuales \pm D.S. ANOVA * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

8.7. Localización celular del AhR y PXR en macrófagos peritoneales de ratón

Una vez identificados los PAMPs que modifican la expresión del *Cyp1a1* y *Cyp3a11*, genes blanco del AhR y PXR, respectivamente, se procedió a evaluar si la exposición a estos PAMPs promueve la translocación nuclear de estos factores de transcripción. Para ello, se determinaron las condiciones para detectar al AhR y al PXR por ensayos de inmunofluorescencia en MΦ's peritoneales de ratón. En la figura 13 se puede apreciar la localización celular del AhR. En el panel A en condiciones basales y en el panel B con el tratamiento con el TCDD. En el primer caso se observa una localización predominantemente citosólica. En contraste, el tratamiento con TCDD resulta en una localización nuclear de cierta cantidad de AhR. De la misma manera, en condiciones basales el PXR se sitúa en el citosol y después de su activación con PCN, aparentemente, una fracción de este se localiza en el núcleo (Figura 14, panel A y B, respectivamente).

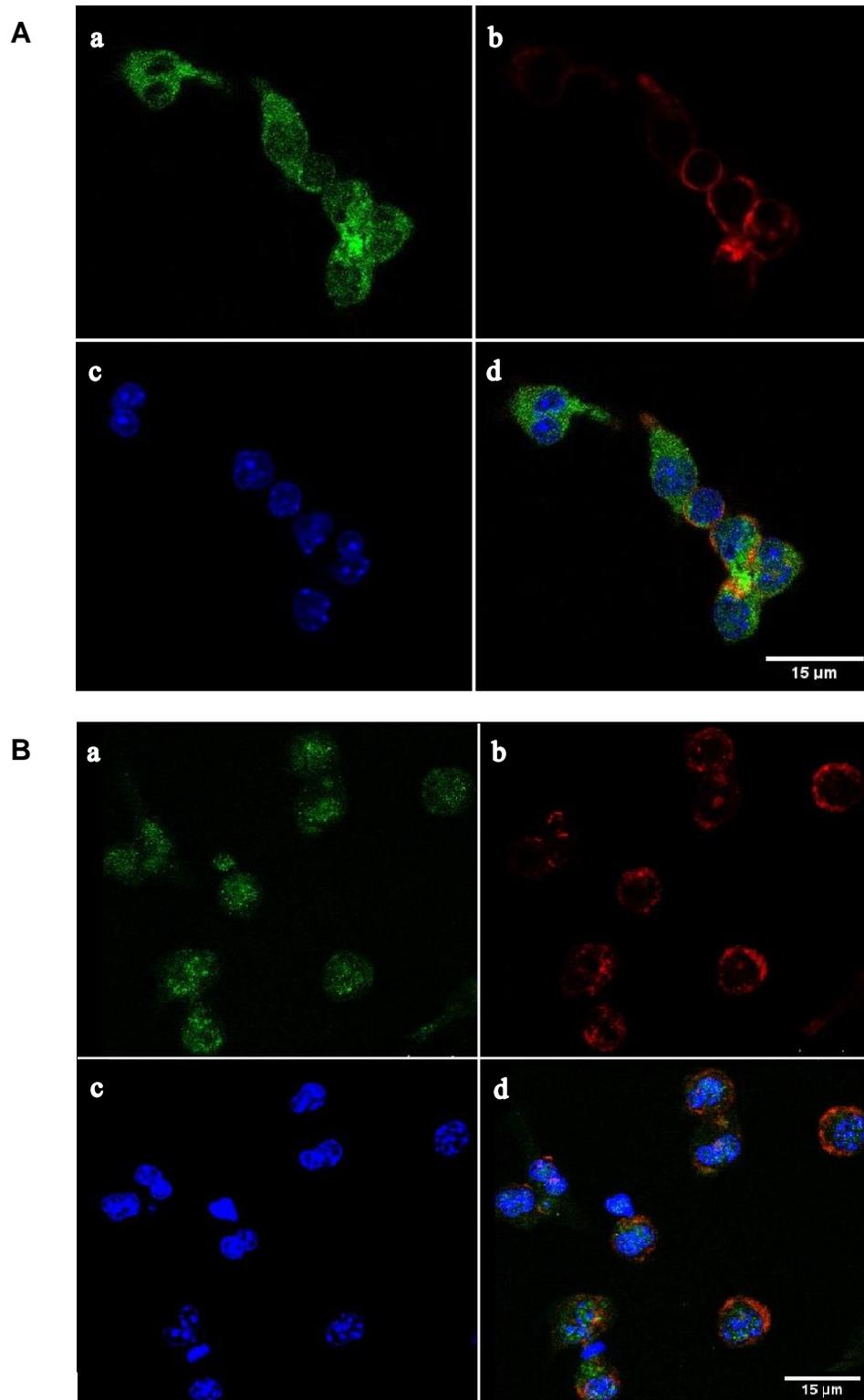


Figura 13. Localización celular del AhR en Mφ's peritoneales de ratón. Condiciones basales (Panel A) y tratados con TCDD (Panel B), determinada por microscopia confocal. El AhR (a), la actina (b) y los núcleos (c), se visualizan en verde, azul y rojo respectivamente. En d se muestra el merge.

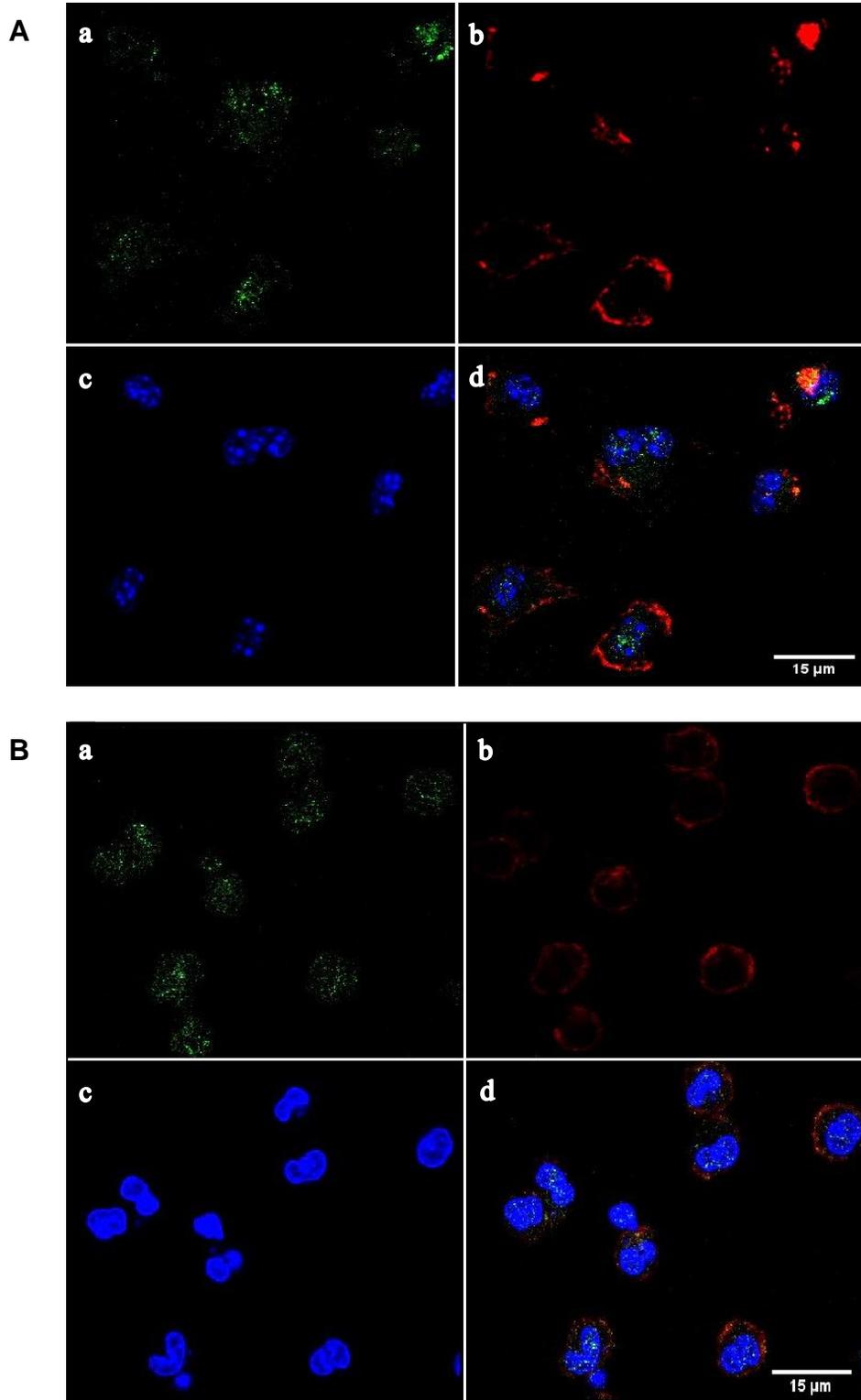


Figura 14. Localización celular del PXR en M ϕ 's peritoneales de ratón. Condiciones basales (Panel A) y tratados con PCN (Panel B), determinada por microscopia confocal. El PXR (a), la actina (b) y los núcleos (c), se visualizan en verde, azul y rojo respectivamente. En d se muestra el merge.

9. DISCUSIÓN

El AhR y el PXR son receptores nucleares cuya función principal es identificar xenobióticos e iniciar como respuesta celular la inducción de la expresión de genes que codifican para enzimas biotransformadoras, principalmente citocromos P450, permitiendo de esta manera, convertirlos a metabolitos más solubles y así poder eliminarlos del organismo (Klotz & Steinbrenner, 2017). Recientemente, su estudio se ha enfocado hacia otros procesos celulares diferentes al de la detoxificación, como la proliferación, migración y diferenciación celular, y la regulación de la respuesta inmune (Climaco-Arvizu et al., 2016; Kawajiri & Fujii-KuriYama, 2017; Oladimeji & Chen, 2018). Es en este último proceso, la regulación del sistema inmune, en el que estos xenosensores han adquirido un importante papel (Pascussi et al., 2008).

En los últimos años se han realizado abundantes estudios con la finalidad de entender el papel de dichos xenosensores en la regulación de diferentes células del sistema inmune, en particular durante procesos infecciosos provocados por diferentes microorganismos. Se ha observado que estos xenosensores, en particular el AhR, pueden identificar compuestos microbianos que participan en la patogenicidad de algunos microorganismos como es el caso de *P. aeruginosa*. Entre dichos compuestos se encuentran las fenazinas, que son importantes en la formación del *quorum sensing* para colonizar tejidos como el pulmonar (Moura-Alves et al., 2019). De este estudio, se ha llegado a proponer la posibilidad de que el AhR pueda actuar como un PRR. Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar si algunos PAMPs, representativos de diferentes microorganismos, propician algún efecto en la actividad tanto del AhR como del PXR, en MΦ's peritoneales de ratón.

Inicialmente, nos enfocamos a determinar si ligandos agonistas del AhR y PXR tienen efectos citotóxicos en los MΦ's peritoneales de ratón. Se ha reportado que el TCDD, un HAH y el ligando con mayor afinidad por el AhR, produce efectos tóxicos a muy bajas concentraciones (Denison & Nagy, 2003). En líneas celulares

derivadas de monocitos, como MΦ's RAW 264.7, a las 24 h de tratamiento con 10 nM de TCDD se observa una disminución en la viabilidad del 20% (Park et al., 2005). Otros reportes muestran que el TCDD sensibiliza a las células RAW 264.7 generando un estrés oxidativo, lo que resulta en un incremento en las especies reactivas y una disminución en su viabilidad. En contraste, los MΦ's peritoneales de ratón son menos sensibles a el tratamiento con 10 nM de TCDD (Pestka & Zhou, 2006). En consonancia, en el presente estudio, la exposición a 10 nM de TCDD por 24 h no provocó una disminución en la viabilidad de los MΦ's peritoneales de ratón. Aún más, tampoco se observaron diferencias cuando se utilizó la concentración de 50 nM de esta dioxina (Figura 7). Se optó por utilizar la concentración de 10 nM de TCDD, ya que es una concentración que ha sido empleada constantemente en nuestro grupo de trabajo para activar al AhR en diversas líneas celulares como Hepa1c1c, HepG2, SHSY-5Y, HeLa (Patel et al., 2009; Yamaguchi & Hankinson, 2019; González-Barbosa et al., 2019; Flores-Pérez & Elizondo, 2018).

El PCN es un compuesto esteroideo endógeno, precursor y metabolito intermediario de hormonas esteroideas (estrógenos, andrógenos, etc.). Es utilizado comúnmente como fármaco o suplemento (Vallée, 2016), y es un ligando con alta afinidad por el PXR de ratón, a diferencia del de humano, donde presenta baja afinidad (Jones et al., 2000). Existen pocos estudios en los que se evalúe el efecto del PCN en MΦ's peritoneales de ratón. Zhou y colaboradores en el 2009 reportaron que el tratamiento con 10 μM de PCN por 24 h no tuvo un efecto citotóxico sobre MΦ's peritoneales de ratón (Zhou et al., 2009). De manera similar nuestros resultados demuestran que a ninguna de las concentraciones empleadas de PCN se apreció un efecto citotóxico.

Una vez establecido que ni el TCDD ni el PCN provocaban citotoxicidad en nuestro modelo de estudio, se procedió a evaluar si eran capaces de activar al AhR y PXR a través de medir la expresión relativa de sus genes blancos.

Cuando se activa el AhR por alguno de sus ligandos, se inicia la transcripción de CYP450s pertenecientes a la familia 1 como son el *Cyp1a1* y *Cyp1a2*, entre otros

(Lin, 2006). En este estudio, se evaluó la expresión del gen *Cyp1a1*. Como podemos observar en la figura 9, a las 4 h de tratamiento con TCDD se observa una inducción de aproximadamente 60 veces, mientras que a las 8 h esta llega a ser hasta de 300 veces respecto al vehículo. Es de llamar la atención los niveles elevados de inducción, lo que sugiere que el *Cyp1a1* podría tener un papel relevante en la fisiología del MΦ's. Lo más probable es que lleva a cabo la biotransformación de PAHs, sustratos del *Cyp1a1*, que de no ser eliminados podrían generar aductos en el DNA (Piihari et al., 2000). Otro papel muy importante del *Cyp1a1* es en la biotransformación de ligandos endógenos, como algunos metabolitos derivados de la vía del ácido araquidónico como las prostaglandinas y leucotrienos, que son activados cuando existe alguna lesión tisular o exposición a diferentes compuestos y los cuales son importantes para la activación de los MΦ's tipo I. Estos generan quimioatrayentes para el reclutamiento de otras células de la respuesta inmune (Byun, et al. 2017). Es probable que los MΦ's expresen altos niveles de *Cyp1a1* en presencia de TCDD como respuesta a un proceso inflamatorio. Además de su participación en procesos de detoxificación, el *Cyp1a1* podría tener un papel en la regulación de la respuesta innata, sin conocerse aún los detalles de ello (Fang et al., 2016). La inducción de la expresión del *Cyp1a1* reportada en nuestro estudio contrasta con la hallada por Zhu y colaboradores, quienes observan una inducción de 10 veces respecto al control. La diferencia podría explicarse debido a que nosotros tratamos a los MΦ's con 10 nM de TCDD por 4 h y 8 h, mientras que ellos utilizaron 1 nM de TCDD por 1 h.

El PXR es capaz de inducir la expresión de CYP450s pertenecientes a la familia 3, principalmente, en el caso de los humanos, el CYP3A4 (Tompkins & Wallace, 2007). En el ratón, su ortólogo es el *Cyp3a11*. El ligando con mayor afinidad por el PXR, en ratón, es el PCN (Manikandan & Nagini, 2018). En la presente investigación se evaluó la inducción de la expresión del gen *Cyp3a11* en MΦ's peritoneales de ratón mediante el tratamiento con PCN. Los resultados demostraron que a una concentración de 50 μM a las 2 y 4 h hay un ligero aumento en la expresión de *Cyp3a11* el cual no es significativo. Sin embargo, a

las 8 h el aumento es de más de 2 veces, el cual es significativamente diferente respecto al vehículo. En la literatura no existen reportes que establezcan la inducción de *Cyp3a11* por PCN en MΦ's peritoneales de ratón, por lo que este resultado es novedoso. En las células de Kupffer (macrófagos hepáticos) de ratón, el *Cyp3a11* lleva a cabo la biotransformación de diferentes fármacos como el acetaminofén, también conocido como paracetamol (Lacour et al., 2009), pero también es importante para la biotransformación de endobióticos como precursores de ácidos biliares, los cuales si no son eliminados pueden provocar daño en el hígado, de tal modo que su expresión es un mecanismo de protección (Goodwin, et al. 2003). El *Cyp3a11* pudiera tener funciones similares en los MΦ's peritoneales. Comparado con la inducción del *Cyp1a1*, el efecto del PCN sobre los niveles del *Cyp3a11* es pequeño. Lo anterior podría deberse a que la presencia de PXR es baja en este tipo celular, a comparación de otras células como hepatocitos y células intestinales, donde llevan a cabo la mayoría de sus funciones (Dussault & Forman, 2002; Kliewer et al., 2002). A pesar de ello, es la primera vez que se demuestra que en MΦ's peritoneales de ratón se puede inducir, con PCN, la expresión del *Cyp3a11*, presumiblemente a través del PXR.

Como se describió en la introducción, los monocitos y MΦ's tienen un papel muy importante en el reconocimiento de microorganismos. Lo hacen a través de la identificación de diferentes PAMPs mediante los PRRs, lo que resulta en el inicio de una respuesta inflamatoria para atenuar la infección (Abbas et al., 2017). Debido al papel que juegan el AhR y el PXR en la inhibición de la respuesta inflamatoria provocada por algunos patógenos (Elizondo et al., 2011; Qiu et al., 2016), se determinó verificar si alguno de los PAMPs más representativos de diferentes microorganismos podía tener un efecto en la activación de estos xenosensores.

El AhR ha sido descrito como un regulador negativo de la respuesta inmune inflamatoria, particularmente en MΦ's (Kimura et al., 2009). Cuando los MΦ's peritoneales fueron tratados con los diferentes PAMPs no se encontró que aumentaran la expresión del *Cyp1a1*. Sin embargo, el zimosano disminuyó en

alrededor de un 50% los niveles basales del transcrito del *Cyp1a1* en comparación a su control. Este resultado concuerda con los datos reportados por Peres, et al. en el 2017. Este grupo de investigación observó que el zimosano, a través de un mecanismo desconocido, inhibe la expresión del *Cyp1a1*. El zimosano podría actuar como un ligando antagonista, bloqueando al AhR en su función como regulador negativo de la respuesta inmune inflamatoria, permitiendo la producción de citocinas inflamatorias como IL-6, IL-1 y el TNF α . En este contexto, sería interesante evaluar primero, si el zimosano inhibe la inducción del *Cyp1a1* mediada por el TCDD y posteriormente, determinar si bloquea la inhibición de la síntesis de citocinas inflamatorias provocada por la activación del AhR.

El PXR también tiene un papel como regulador negativo de la respuesta inflamatoria. Se ha reportado que cuando se silencia al PXR, aumenta la expresión de TNF- α , el cual a través de su vía de señalización disminuye el potencial de membrana mitocondrial y aumenta la producción de ROS, lo cual provoca la disminución de monocitos y la sobrevivencia de *M. tuberculosis* (Bhagyaraj et al., 2016). En este trabajo, observamos que sólo el sonicado del virus del dengue serotipo 2 incrementa la expresión del *Cyp3a11* hasta casi 4 veces respecto al control. Es de llamar la atención que dicho incremento es significativamente mayor al observado cuando los M Φ 'smacrófagos son tratados con el PCN, agonista prototipo del PXR.

En la literatura no existen reportes que muestren que el DENV-2 pueda activar al PXR o inducir la expresión de CYP450s. El mecanismo a través del cual el DENV-2 podría activar al PXR se desconoce, sin embargo, existe en la literatura información que nos permite hipotetizar que es a través de la desfosforilación del PXR. Mediante un análisis de microarreglos en diferentes poblaciones tropicales con la enfermedad del Dengue, se observó que estas presentaban un aumento en la expresión de *PPP2R5E*, una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Oliveira et al., 2018). Esta enzima, al desfosforilar al PXR promueve, en el citoplasma, su separación de sus correpresores lo que resulta en su translocación al núcleo y la transcripción de sus genes blanco (Figura 5) (di Masi et al., 2009).

Considerando lo anterior, es posible que el incremento en la expresión de *PPP2R5E* provocada por el virus active al PXR provocando el aumento observado en los niveles de *Cyp3a11*.

En el presente estudio también se planteó determinar la activación del AhR y PXR a través de evaluar su localización nuclear. En las figuras 13 y 14 se muestran ensayos de inmunofluorescencia en los que se aprecia, en condiciones basales, a ambos xenosensores en el citoplasma. Posterior a su activación con TCDD o PCN, se aprecia una localización nuclear del AhR y PXR, respectivamente. Sin embargo, la internalización nuclear es baja, posiblemente a que se requieren ajustes en el método. Una vez establecidas las condiciones óptimas, se procederá a evaluar el efecto de los PAMPs sobre la localización celular del AhR y PXR.

La aparición de homólogos del AhR se remonta hace 600 millones de años, al phylum Cnidaria (medusas), pero es en el origen de los primeros vertebrados hace 500 millones de años, que se empieza a diversificar su función en el sistema vascular, reproductivo e inmune. En este último, es posible que su papel principal fuera la identificación de moléculas derivadas de microorganismos comensales y patogénicos. Posteriormente, con la diversificación de vertebrados y diferentes estilos de vida, comenzó a desarrollar otras funciones, convirtiéndose en uno de los principales sensores de xenobióticos (Kawajiri, et al. 2009; Hahn, et al. 2017).

Por otro lado, el origen del PXR es de hace aproximadamente 310 millones de años, apareciendo en una infraclase de actinopterigios llamada teleósteos. Su función es más complicada de comprender. Actualmente identifica múltiples ligandos, pero sus funciones en un principio estaban limitadas a identificar compuestos derivados de sales biliares y responder con la transcripción de genes que metabolizan dichos compuestos. Con esta información podríamos suponer que en sus inicios pudo haber detectado DAMPs, activándolo para ejercer una respuesta en la inflamación, y posteriormente, esto haya derivado a un posible papel como PRR ante diversos PAMPs derivados de microorganismos, lo cual podría justificar su participación en la regulación inflamatoria (Krasowski, et al. 2011; Eide, et al. 2018).

Se requieren de más estudios, evolutivos y funcionales, para considerar a estos y otros xenosensores como PRRs en la respuesta inmune innata. Sin embargo, los datos obtenidos en este estudio, junto con los reportados previamente, indican que es importante continuar evaluando esta posibilidad.

10. CONCLUSIONES

- Los ligandos utilizados para inducir la expresión de genes blanco del AhR y PXR no tienen un efecto sobre la viabilidad celular de los MΦ's peritoneales de ratón.
- El TCDD y el PCN inducen la expresión del *Cyp1a1* y *Cyp3a11*, respectivamente, en los MΦ's peritoneales de ratón.
- El zimosano inhibe la expresión basal del *Cyp1a1*, sugiriendo un efecto antagonista sobre el AhR.
- El DENV-2 induce la expresión del *Cyp3a11*, sugiriendo un efecto agonista sobre el PXR.

11. PERSPECTIVAS

- Realizar tratamientos con diferentes compuestos patogénicos de hongos similares al zimosano, y verificar si son capaces de inhibir la activación del AhR.
- Identificar qué compuesto del DENV-2 es el que permite la activación del PXR, así como determinar a través de cual vía ocurre este proceso.
- Evaluar el efecto del zimosano y DENV-2 sobre la producción de citocinas.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2017). Cellular and molecular immunology. 9th. *Journal of Experimental Medicine: Elsevier*, 608.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.
- Anzenbacher, P., & Zanger, U. M. (2012). *Metabolism of drugs and other xenobiotics*: Wiley Online Library.
- Bhagyaraj, E., Nanduri, R., Saini, A., Dkhar, H. K., Ahuja, N., Chandra, V., . . . Sharma, C. (2016). Human xenobiotic nuclear receptor PXR augments Mycobacterium tuberculosis survival. *The Journal of Immunology*, 197(1), 244-255.
- Brixius-Anderko, S. (2016). Biotechnological application of steroidogenic cytochromes P450.
- Byun, K., Yoo, Y., Son, M., Lee, J., Jeong, G. B., Park, Y. M., ... & Lee, B. (2017). Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 177, 44-55.
- Climaco-Arvizu, S., Domínguez-Acosta, O., Cabañas-Cortés, M. A., Rodríguez-Sosa, M., Gonzalez, F. J., Vega, L., & Elizondo, G. (2016). Aryl hydrocarbon receptor influences nitric oxide and arginine production and alters M1/M2 macrophage polarization. *Life sciences*, 155, 76-84.
- Connell, D. W. (2018). *Bioaccumulation of Xenobiotic Compounds: 0*: CRC Press.
- Dancygier, H. (2009). *Clinical hepatology: Principles and practice of hepatobiliary diseases* (Vol. 2): Springer Science & Business Media.
- de Montellano, P. R. O. (2015). Substrate oxidation by cytochrome P450 enzymes *Cytochrome P450* (pp. 111-176): Springer.
- Denison, M. S., & Nagy, S. R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43(1), 309-334.

- di Masi, A., De Marinis, E., Ascenzi, P., & Marino, M. (2009). Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Molecular aspects of medicine*, 30(5), 297-343.
- Domínguez-Acosta, O., Vega, L., Estrada-Muñiz, E., Rodríguez, M., Gonzalez, F., & Elizondo, G. (2018). Activation of aryl hydrocarbon receptor regulates the LPS/IFN γ -induced inflammatory response by inducing ubiquitin-proteosomal and lysosomal degradation of RelA/p65. *Biochemical pharmacology*, 155, 141-149.
- Dussault, I., & Forman, B. M. (2002). The nuclear receptor PXR: a master regulator of "homeland" defense. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 12(1).
- Eaton, D. L., & Gilbert, S. G. (2008). Principles of toxicology. *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. CD Klaassen (ed)*, 11-34.
- Eide, M., Rydbeck, H., Tørresen, O. K., Lille-Langøy, R., Puntervoll, P., Goldstone, J. V., ... & Karlsen, O. A. (2018). Independent losses of a xenobiotic receptor across teleost evolution. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- Elizondo, G., Rodríguez-Sosa, M., Estrada-Muñiz, E., Gonzalez, F. J., & Vega, L. (2011). Deletion of the aryl hydrocarbon receptor enhances the inflammatory response to *Leishmania major* infection. *International journal of biological sciences*, 7(9), 1220.
- Fang, X., Zhao, W., Xu, J., Tu, F., Wang, X., Li, B., . . . Ren, S. (2016). CYP1A1 mediates the suppression of major inflammatory cytokines in pulmonary alveolar macrophage (PAM) cell lines caused by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Developmental & Comparative Immunology*, 65, 132-138.
- Flores-Pérez, A., & Elizondo, G. (2018). Apoptosis induction and inhibition of HeLa cell proliferation by alpha-naphthoflavone and resveratrol are aryl hydrocarbon receptor-independent. *Chemico-biological interactions*, 281, 98-105.
- Fukunaga, B. N., Probst, M. R., Reisz-Porszasz, S., & Hankinson, O. (1995). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29270-29278.

- González-Barbosa, E., García-Aguilar, R., Vega, L., Cabañas-Cortés, M. A., Gonzalez, F. J., Segovia, J., . . . Elizondo, G. (2019). Parkin is transcriptionally regulated by the aryl hydrocarbon receptor: Impact on α -synuclein protein levels. *Biochemical pharmacology*, *168*, 429-437.
- Goodwin, B., Gauthier, K. C., Umetani, M., Watson, M. A., Lochansky, M. I., Collins, J. L., ... & Repa, J. J. (2003). Identification of bile acid precursors as endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane X receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(1), 223-228.
- Guengerich, F. P., Wu, Z.-L., & Bartleson, C. J. (2005). Function of human cytochrome P450s: characterization of the orphans. *Biochemical and biophysical research communications*, *338*(1), 465-469.
- Hahn, M. E., Karchner, S. I., & Merson, R. R. (2017). Diversity as opportunity: insights from 600 million years of AHR evolution. *Current opinion in toxicology*, *2*, 58-71.
- Hubbard, T. D., Murray, I. A., Bisson, W. H., Lahoti, T. S., Gowda, K., Amin, S. G., . . . Perdew, G. H. (2015). Adaptation of the human aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. *Scientific reports*, *5*, 12689.
- Im, S.-C., & Waskell, L. (2011). The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b5. *Archives of biochemistry and biophysics*, *507*(1), 144-153.
- Isin, E. M., & Guengerich, F. P. (2007). Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1770*(3), 314-329.
- Jones, S. A., Moore, L. B., Shenk, J. L., Wisely, G. B., Hamilton, G. A., McKee, D. D., . . . Willson, T. M. (2000). The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Molecular endocrinology*, *14*(1), 27-39.
- Kanneganti, T.-D., Lamkanfi, M., & Núñez, G. (2007). Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, *27*(4), 549-559.

- Kawajiri, K., & Fujii-KuriYama, Y. (2017). The aryl hydrocarbon receptor: a multifunctional chemical sensor for host defense and homeostatic maintenance. *Experimental animals*, 66(2), 75-89.
- Kimura, A., Naka, T., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., . . . Kishimoto, T. (2009). Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *Journal of Experimental Medicine*, 206(9), 2027-2035.
- Klaassen, C. D., & Amdur, M. O. (2013). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons* (Vol. 1236): McGraw-Hill New York.
- Kliewer, S. A., Goodwin, B., & Willson, T. M. (2002). The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocrine reviews*, 23(5), 687-702.
- Klotz, L.-O., & Steinbrenner, H. (2017). Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. *Redox biology*, 13, 646-654.
- Komura, K., Hayashi, S.-i., Makino, I., Poellinger, L., & Tanaka, H. (2001). Aryl hydrocarbon receptor/dioxin receptor in human monocytes and macrophages. *Molecular and cellular biochemistry*, 226(1-2), 107-117.
- Krasowski, M. D., Ni, A., Hagey, L. R., & Ekins, S. (2011). Evolution of promiscuous nuclear hormone receptors: LXR, FXR, VDR, PXR, and CAR. *Molecular and cellular endocrinology*, 334(1-2), 39-48.
- Lacour, S., Antonios, D., Gautier, J.-C., & Pallardy, M. (2009). Acetaminophen and lipopolysaccharide act in synergy for the production of pro-inflammatory cytokines in murine RAW264. 7 macrophages. *Journal of immunotoxicology*, 6(2), 84-93.
- Life technologies. (2014). Introducción a PCR en Tiempo Real sistema StepOne™ y StepOne Plus™. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/323589869/2014-MANUAL-StepOne-Showroom-RQ-v1-1>
- Lin, J. H. (2006). CYP induction-mediated drug interactions: in vitro assessment and clinical implications. *Pharmaceutical research*, 23(6), 1089-1116.

- Manikandan, P., & Nagini, S. (2018). Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review. *Current drug targets*, 19(1), 38-54.
- Medzhitov, R., & Janeway Jr, C. (2000). Innate immunity. *New England Journal of Medicine*, 343(5), 338-344.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*, 22(2), 240-273.
- Moreau, A., Vilarem, M. J., Maurel, P., & Pascussi, J. M. (2007). Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response. *Molecular pharmaceutics*, 5(1), 35-41.
- Moura-Alves, P., Faé, K., Houthuys, E., Dorhoi, A., Kreuchwig, A., Furkert, J., . . . Constant, P. (2014). AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence. *Nature*, 512(7515), 387.
- Moura-Alves, P., Puyskens, A., Stinn, A., Klemm, M., Gühlich-Bornhof, U., Dorhoi, A., . . . Lozza, L. (2019). Host monitoring of quorum sensing during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Science*, 366(6472).
- O'Neill, L. A., & Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 7(5), 353.
- Oladimeji, P. O., & Chen, T. (2018). PXR: more than just a master xenobiotic receptor. *Molecular pharmacology*, 93(2), 119-127.
- Oliveira, M., Lert-Itthiporn, W., Cavadas, B., Fernandes, V., Chuansumrit, A., Anunciação, O., . . . Tangnararatchakit, K. (2018). Joint ancestry and association test indicate two distinct pathogenic pathways involved in classical dengue fever and dengue shock syndrome. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(2).
- Park, S.-J., Yoon, W.-K., Kim, H.-J., Son, H.-Y., Cho, S.-W., Jeong, K.-S., . . . Ryu, S.-Y. (2005). 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin activates ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in RAW 264.7 cells. *Anticancer research*, 25(4), 2831-2836.

- Parkinson, A., Ogilvie, B. W., Buckley, D. B., & Parkinson, O. (2019). Biotransformation of xenobiotics. *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons*, 6, 193-401.
- Pascussi, J.-M., Gerbal-Chaloin, S., Duret, C., Daujat-Chavanieu, M., Vilarem, M.-J., & Maurel, P. (2008). The Tangle of Nuclear Receptors that Controls Xenobiotic Metabolism and Transport: Crosstalk and Consequences. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48(1), 1-32. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105349
- Patel, R. D., Murray, I. A., Flaveny, C. A., Kusnadi, A., & Perdew, G. H. (2009). Ah receptor represses acute-phase response gene expression without binding to its cognate response element. *Laboratory investigation*, 89(6), 695-707.
- Pavek, P. (2016). Pregnane X receptor (PXR)-mediated gene repression and cross-talk of PXR with other nuclear receptors via coactivator interactions. *Frontiers in pharmacology*, 7, 456.
- Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., & Raunio, H. (2008). Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of toxicology*, 82(10), 667-715.
- Pestka, J., & Zhou, H.-R. (2006). Toll-like receptor priming sensitizes macrophages to proinflammatory cytokine gene induction by deoxynivalenol and other toxicants. *Toxicological Sciences*, 92(2), 445-455.
- Piipari, R., Savela, K., Nurminen, T., Hukkanen, J., Raunio, H., Hakkola, J., . . . Boobis, A. R. (2000). Expression of CYP1A1, CYP1B1 and CYP3A, and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in bronchoalveolar macrophages of smokers and non-smokers. *International journal of cancer*, 86(5), 610-616.
- Qiao, E., Ji, M., Wu, J., Ma, R., Zhang, X., He, Y., . . . Tang, J. (2013). Expression of the PXR gene in various types of cancer and drug resistance. *Oncology letters*, 5(4), 1093-1100.
- Qiu, Z., Cervantes, J. L., Cicek, B. B., Mukherjee, S., Venkatesh, M., Maher, L. A., . . . Khanna, K. M. (2016). Pregnane x receptor regulates pathogen-induced

- inflammation and host defense against an intracellular bacterial infection through Toll-like receptor 4. *Scientific reports*, 6, 31936.
- Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., . . . Weiner, H. L. (2008). Control of T reg and T H 17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 453(7191), 65.
- Quintana, F. J., & Sherr, D. H. (2013). Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. *Pharmacological reviews*, 65(4), 1148-1161.
- Raunio, H., Kuusisto, M., Juvonen, R. O., & Pentikäinen, O. T. (2015). Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Frontiers in pharmacology*, 6, 123.
- Shizu, R., Abe, T., Benoki, S., Takahashi, M., Kodama, S., Miyata, M., . . . Yoshinari, K. (2016). PXR stimulates growth factor-mediated hepatocyte proliferation by cross-talk with the FOXO transcription factor. *Biochemical Journal*, 473(3), 257-266.
- Squires, E. J., Sueyoshi, T., & Negishi, M. (2004). Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand-dependent nuclear translocation in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49307-49314.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M. K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., . . . Honda, K. (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*, 448(7152), 501.
- Thurmond, T., & Gasiewicz, T. (2000). A single dose of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin produces a time-and dose-dependent alteration in the murine bone marrow B-lymphocyte maturation profile. *Toxicological Sciences*, 58(1), 88-95.
- Tompkins, L. M., & Wallace, A. D. (2007). Mechanisms of cytochrome P450 induction. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 21(4), 176-181.
- Vallée, M. (2016). Neurosteroids and potential therapeutics: focus on pregnenolone. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 160, 78-87.

- Wager, C. M. L., Arnett, E., & Schlesinger, L. S. (2019). Macrophage nuclear receptors: Emerging key players in infectious diseases. *PLoS pathogens*, 15(3).
- Wagner Jr, J. E., Brunstein, C. G., Boitano, A. E., DeFor, T. E., McKenna, D., Sumstad, D., . . . Jones, J. (2016). Phase I/II trial of StemRegenin-1 expanded umbilical cord blood hematopoietic stem cells supports testing as a stand-alone graft. *Cell Stem Cell*, 18(1), 144-155.
- Yamaguchi, M., & Hankinson, O. (2019). 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses the growth of human colorectal cancer cells in vitro: Implication of the aryl hydrocarbon receptor signaling. *International journal of oncology*, 54(4), 1422-1432.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., . . . Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology*, 5(7), 730.
- Zhou, C., King, N., Chen, K. Y., & Breslow, J. L. (2009). Activation of PXR induces hypercholesterolemia in wild-type and accelerates atherosclerosis in apoE deficient mice. *Journal of lipid research*, 50(10), 2004-2013.
- Zhou, C., Tabb, M. M., Nelson, E. L., Grün, F., Verma, S., Sadatrafiei, A., . . . Thummel, K. E. (2006). Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF-κB signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 116(8), 2280-2289.
- Zhu, J., Luo, L., Tian, L., Yin, S., Ma, X., Cheng, S., . . . Zhou, X. (2018). Aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 expression in inflammatory macrophages through Src-STAT3 signaling pathway. *Frontiers in immunology*, 9, 2033.
- Zucchini, N., de Sousa, G., Bailly-Maitre, B., Gugenheim, J., Bars, R., Lemaire, G., & Rahmani, R. (2005). Regulation of Bcl-2 and Bcl-xL anti-apoptotic protein expression by nuclear receptor PXR in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1745(1), 48-58.

