



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“Expresión y localización del receptor para
hidrocarburos de arilo (AHR), en células de
hipocampo humano, durante el
envejecimiento”**

TESIS

Que presenta:

M. C. Nichte Alaide Ramos García

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR

Directores de tesis:

Dr. Guillermo Elizondo Azuela

Dra. Mónica A. Torres Ramos

Ciudad de México

Noviembre, 2018

El presente estudio fue realizado en el laboratorio 20 del departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y en la Unidad Periférica de Neurociencias INNN/UNAM del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, bajo la cotutoría del Dr. Guillermo Elizondo Azuela y la Dra. Mónica A. Torres Ramos. Con la asesoría del Dr. José Manuel Hernández Hernández y la Dra. Claudia Pérez Cruz.

Durante la realización de este trabajo, la M.C. Nichte Alaide Ramos García recibió la beca 783408 otorgada por CONACyT. Asimismo, el proyecto fue financiado con el apoyo de CONACyT-FOSISS: SALUD-2015-1-262295.

Los tejidos fueron proporcionados por el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” con la asesoría del Dr. Erick Gómez Apo y la Dra. Laura Graciela Chávez Macías.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Guillermo Elizondo Azuela y a la Dra. Mónica A. Torres Ramos por la oportunidad que me brindaron de trabajar en su laboratorio, por los momentos de asesoría, confianza, apoyo y atención.

Agradezco a mis asesores: Dr. Manuel Hernández Hernández y la Dra. Claudia Pérez Cruz por su contribución y atención.

Agradezco al Dr. Francisco García Sierra y a sus estudiantes por su asesoría, colaboración en el desarrollo del proyecto y permitirme trabajar en su laboratorio.

Agradezco a la Dra. María Asunción Cabañas Cortés por su enseñanza y colaboración en el desarrollo de este proyecto.

Agradezco al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por abrirme las puertas y brindarme un entorno de crecimiento profesional y humano.

Agradezco al Hospital General “Dr. Eduardo Liceaga” y a los doctores Erick Gómez Apo y la Dra. Laura Graciela Chávez Macías por proporcionar los tejidos de hipocampo.

Agradezco al departamento de Biología Celular del CINVESTAV y a los profesores investigadores que contribuyeron en mi formación y que alentaron en mí el deseo de integrarme a la investigación científica en México.

Agradezco al CONACyT por brindarme los recursos para la realización de este proyecto a través de la beca 783408.

DEDICATORIAS

Éste trabajo y todo el esfuerzo que conllevo, se los dedico a mi esposo, papás, primos, tíos, abuelitos y amigos. Por recorrer conmigo todo el tiempo este camino, con su apoyo, consejos, paciencia y ánimos, y sin ellos, hubiese sido un camino largo y sinuoso. En cambio, lo hicieron más ameno y feliz.

RESUMEN

El envejecimiento es la consecuencia de la acumulación de una gran variedad de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo, lo que lleva a un descenso gradual de las capacidades físicas y mentales, un aumento del riesgo de enfermedad y finalmente la muerte. El envejecimiento en el sistema nervioso central (SNC) se distingue principalmente por una inflamación crónica caracterizada por células senescentes, citocinas proinflamatorias y un aumento de radicales libres de oxígeno entre otros cambios. El receptor para hidrocarburos arilo (AHR) es un factor de transcripción que participa en la modulación de la respuesta inflamatoria, regulando la inflamación negativamente. Actualmente, existe evidencia en modelos animales que muestran que cambios en los niveles del AHR favorece la aparición de características presentes durante el envejecimiento en diferentes sistemas. Sin embargo, no existe información de la expresión de este factor de transcripción y su participación durante el envejecimiento en el SNC en humanos. Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión del AHR en muestras humanas *postmortem* de hipocampo durante el envejecimiento. Para ello se utilizaron tejidos de hipocampo humano de jóvenes de entre 20-30 años y mayores de 60 años, en los cuales se detectó y cuantificó la presencia del AHR mediante la técnica de inmunohistoquímica. Los resultados indican que existe un aumento en la expresión del AHR en los tejidos de hipocampo humano de personas mayores de 60 años. También se demostró mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, que el AHR se expresa en astrocitos y en microglia.

ABSTRACT

Aging is the consequence of the accumulation of a great variety of molecular and cellular damage over time, which leads to a gradual decrease in physical and mental abilities, an increased risk of illness and finally death. In the central nervous system (CNS) aging can be distinguished as chronic inflammation characterized by senescent cells, pro-inflammatory cytokines and an increase in oxygen free radicals, among other changes. The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a transcription factor that participates in the modulation of the inflammatory response by regulating inflammation negatively. Currently there is evidence in animal models showing that changes on the levels of AHR induces the appearance of characteristics present during aging in different systems. However, there is no information regarding the expression of this transcription factor and its role during aging in the human CNS. For this reason the objective of the present study was to evaluate the expression of AHR in human hippocampal postmortem samples during aging. To this end, human hippocampal tissues of young people aged 20-30 years and older than 60 years were used to detect and quantify the presence of the AHR through immunohistochemistry technique. The results indicate that there is an increase in the expression of AHR in the human hippocampal tissues older than 60 years. Besides, it was shown by immunofluorescence and confocal microscopy that the AHR is expressed in astrocytes and microglia.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
ÍNDICE GENERAL	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Envejecimiento	12
1.2. Envejecimiento en sistema nervioso	13
1.2.1. Envejecimiento en sistema nervioso a nivel celular.	14
1.3. Receptor para Hidrocarburos Aro (AHR)	16
1.3.1. Ligandos del AHR	20
1.3.2. Funciones del AHR	22
1.3.3. Funciones del AHR en el sistema nervioso.	24
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo General	25
4.2. Objetivos Particulares	25
5. MÉTODOS	26
5.1. Diseño experimental	26
5.2. Muestras de hipocampo	26
5.3. Inclusión de tejidos y preparación de laminillas	28
5.4. Tinción de Hematoxilina y Eosina	29
5.5. Inmunohistoquímica	29
5.6. Inmunofluorescencia	30
5.7. Análisis estadístico	31
6. RESULTADOS	32
6.1. Integridad del tejido	32
6.2. Células gliales reactivas.	34

6.3. Expresión de AHR en hipocampo humano	40
6.4. Expresión del AHR en células gliares	43
7. DISCUSIÓN	45
8. CONCLUSIONES	49
9. PERSPECTIVAS	50
10. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores que favorecen la neuroinflamación	16
Figura 2. Estructura (A) y vía de señalización del AHR (B)	18
Figura 3. Expresión de AHR en diferentes órganos en el humano.	19
Figura 4. Ligandos del AHR	22
Figura 5. Integridad del tejido de hipocampo, región CA1.	33
Figura 6. Integridad del tejido de hipocampo, región CA3.	34
Figura 7. Expresión de GFAP en la región CA1 del hipocampo humano.	36
Figura 8. Expresión de GFAP en la región CA3 del hipocampo humano.	37
Figura 9. Expresión de Iba1 en la región CA1 de hipocampo humano.	38
Figura 10. Expresión de Iba1 en la región CA3 de hipocampo humano.	39
Figura 11. Expresión del AHR en el hígado de ratón.	40
Figura 12. Expresión de AHR en la región CA1 del hipocampo humano.	41
Figura 13. Expresión de AHR en la región CA3 del hipocampo humano.	42
Figura 14. Expresión de AHR en astrocitos.	43
Figura 15. Expresión de AHR en microglia.	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sexo y edad de los pacientes

27

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Ángstrom
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AHR	Receptor para hidrocarburos arilo
AHRR	Represor del receptor para hidrocarburos arilo
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNT	Traslocador nuclear del receptor para hidrocarburos arilo
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
bHLH	Estructura hélice-bucle-hélice básica
CA1	Cornu Ammonis 1 del hipocampo
CA3	Cornu Ammonis 2 del hipocampo
CD	Célula dendrítica
CYP1A1	Citocromo P4501A1
CYP1A2	Citocromo P4501A2
EAE	Encefalitis autoinmune experimental
FICZ	6-formilindol-carbazol
GFAP	Proteína ácida glial fibrilar
HSP90	Proteína de shock térmico de 90 kDa
IFN-1	Interferón tipo 1
IFN-β	Interferón beta
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-22	Interleucina 22
LPS	Lipopolisacárido
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2
MMP	Metaloproteinasa de matriz extracelular
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

OMS	Organización Mundial de la Salud
PAS	Per-Arnt-Sim
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
RelA/p65	Factor de transcripción p65
SAPS	Fenotipo de secreción asociado a senescencia
SNC	Sistema Nervioso Central
TCDD	2,3,7,8-Tetraclorordibenzeno- <i>p</i> -dioxina
Th17	Linfocitos T cooperadores productores de interleucina 17
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocitos T reguladores
XAP2	Proteína de interacción con el receptor de arilo
XRE	Elemento de respuesta a xenobióticos

1. Introducción

1.1. Envejecimiento

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al envejecimiento como la consecuencia de la acumulación de una gran variedad de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo, lo que lleva a un descenso gradual de las capacidades físicas y mentales, un aumento del riesgo de enfermedad y finalmente la muerte (OMS, 2015).

Por otro lado, la OMS también menciona algunos cambios demográficos importantes a considerar como son:

- Entre el 2015 y 2050, el porcentaje de los habitantes del planeta mayores de 60 años casi se duplicará, pasando del 12% al 22%.
- Para 2020, el número de personas mayores de 60 años o más será superior al de niños menores de 5 años.
- Todos los países se enfrentarán a retos importantes para garantizar que sus sistemas sanitarios y sociales estén preparados para afrontar ese cambio demográfico.

Es considerado por muchos autores y por la Secretaría de Salud del Gobierno Federal de México que el principal factor de riesgo para enfermedades crónico-degenerativas es el envejecimiento. Asimismo, indica que las enfermedades más frecuentes en México durante el envejecimiento son cataratas, osteoartritis, neumopatías, diabetes, depresión y demencias. (Programa Sectorial de Salud 2013-2018).

Debido al incremento de la población senil en el mundo, incluyendo a México, las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y la demencia senil, han aumentado en incidencia. En particular, se estima que cada 20 años se duplicarán los casos de demencia senil. Las demencias constituyen las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores de 60 años en el mundo entero (OMS, 2017).

1.2. Envejecimiento en sistema nervioso

El sistema nervioso, al igual que otros sistemas, presenta cambios macroscópicos y microscópicos importantes que son observables durante el envejecimiento. Las características clínicas que se pueden observar en personas mayores de 60 años son una disminución de habilidades motrices [1]; memoria operativa, es decir, la memoria para realizar alguna acción previamente aprendida [2]; memoria prospectiva que se refiere a realizar una acción en un punto determinado en el futuro [3]; memoria espacial [4] y la características más notoria, la pérdida de la memoria episódica a corto, mediano y largo plazo, cuya disminución se correlaciona con la atrofia del hipocampo, región ubicada en la corteza del lóbulo temporal [5]. Sin embargo, el vocabulario y el conocimiento aprendido con experiencias importantes, no se ve modificado [6].

El principal cambio observable a nivel macroscópico en cerebro es una atrofia global de la masa encefálica, que varía entre individuos de un 0.2-0.5% al año. Esta atrofia se presenta en promedio a partir de los 60 años de edad. Sin embargo, existen regiones del cerebro con mayor atrofia que otras. Las regiones con mayor porcentaje de atrofia son los lóbulos de corteza frontal y corteza entorrenal con un porcentaje de atrofia anual de 2.4% y el hipocampo con un 0.79% a 2.0% de atrofia anual. Esta última estructura es la que presenta un mayor declive de volumen después de los 60 años. Dichos cambios correlacionan con los cambios cognitivos antes mencionados [6, 7]. Robert Katzman y colaboradores en 1988 describieron que la disminución en el volumen de la masa encefálica se debe en gran medida a una pérdida en la plasticidad sináptica, disminución en el número de sinapsis entre neuronas y disminución en la cantidad de mielina [8].

1.2.1. Envejecimiento en sistema nervioso a nivel celular.

Los cambios macroscópicos previos se deben a cambios ocurridos a nivel celular en los distintos linajes celulares que componen al sistema nervioso como son las neuronas, astrocitos, microglia, oligodendrocitos, entre otros. A continuación, se describen algunos de los cambios presentes en los diferentes tipos de células.

En neuronas se puede observar un aumento en la expresión de proteínas que regulan el ciclo celular como p21, además de un fenotipo de secreción asociado a senescencia [9], un cambio en el tamaño y forma de las mitocondrias y una disminución en la producción de ATP [10], así como una mayor producción mitocondrial de ROS [11]. También se puede observar una disminución en la actividad del proteosoma con la consecuente acumulación de proteínas oxidadas o mal plegadas y no funcionales [12], entre otros cambios.

En astrocitos se ha observado que durante el envejecimiento el metabolismo anaerobio de estas células disminuye y aumenta el metabolismo aerobio, lo cual genera estrés oxidante y una disminución del aporte energético otorgado a las neuronas [13]. Además, existe una gliosis reactiva caracterizada por hipertrofia de esta estirpe celular y un aumento en la expresión de proteína ácida glial fibrilar (GFAP) que es una proteína que compone filamentos intermedios y se utiliza como marcador específico de astrocitos [14]. También desarrollan un fenotipo de secreción asociado a senescencia. Este se caracteriza por la secreción basal de interleucinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β , IL-6, entre otras [15]. La senescencia se refiere a pérdida de la capacidad de replicación celular ante estímulos de proliferación o pro-oncogénicos de manera irreversible.

Por otro lado, la microglia o los macrófagos del SNC presentan un cambio morfológico caracterizado por hipertrofia durante el envejecimiento y disminución en el número de ramificaciones, así como un aumento en la proliferación ante un estímulo que active a la microglia, como por ejemplo generar un daño a un nervio [16].

Damani y colaboradores observaron que existe una menor motilidad o capacidad de migración de la microglia envejecida comparada con la joven. Debido a estos cambios se le ha nombrado microglia distrófica. También, se ha observado que durante el envejecimiento la microglia secreta principalmente interleucinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β , IL-6, entre otras [17]. Además, de secretar interleucinas proinflamatorias tienen mayor sensibilidad a las mismas, debido a un aumento en los receptores tipo Toll-like [18].

De acuerdo con Soreq y colaboradores los principales genes que incrementan su expresión durante el envejecimiento en todo el cerebro son los genes correspondientes a la respuesta inmune y al transporte de proteínas. También señalan que la estructura con mayor expresión de genes modificada durante el envejecimiento es el hipocampo [19].

Otro hallazgo durante el envejecimiento normal y patológico es la presencia de agregados de β -amiloide y marañas de proteína Tau, siendo más abundantes por lo general en la enfermedad de Alzheimer y otras demencias que en un envejecimiento normal. Una de las regiones que acumula más de estos agregados proteicos es el hipocampo. [20].

Todos los cambios anteriores que se presentan en las células senescentes del sistema nervioso, en particular en astrocitos y microglía, favorecen un ambiente proinflamatorio crónico, que es considerado por algunos autores como la principal característica que exacerba el envejecimiento y con él, el deterioro cognitivo durante el envejecimiento normal y de enfermedades neurodegenerativas como las previamente mencionadas (Figura 1) [21, 22].

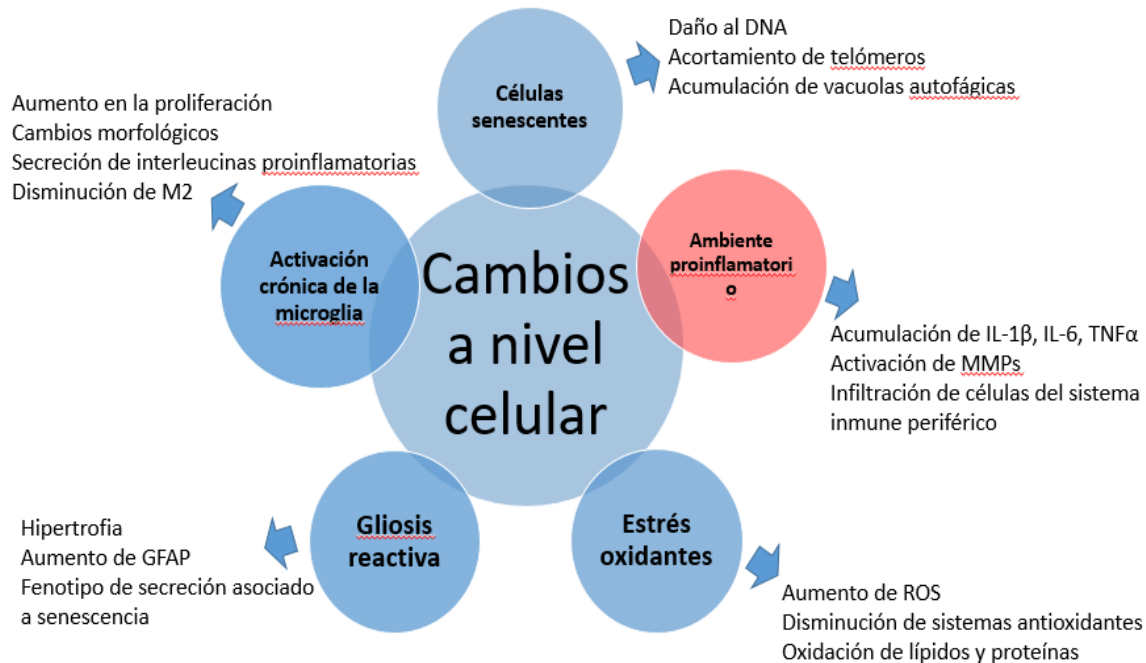


Figura 1. Factores que favorecen la neuroinflamación.

1.3. Receptor para Hidrocarburos Arilo (AHR)

El receptor para hidrocarburos arilo o AHR (por sus siglas en inglés), es un factor de transcripción perteneciente a los factores de transcripción con estructura de Hélice-Bucle-Hélice básica (bHLH) de unión al ADN. Así mismo, pertenece a la familia de los factores de transcripción Per-Arnt-Sim debido a que contiene dominios PAS en su estructura. Además, es un factor de transcripción capaz de ser activado por ligandos exógenos y endógenos, de manera que censa señales intracelulares y extracelulares.

Está conformado por un dominio de unión a ADN ubicado en su extremo amino terminal que le permite unirse a la cadena de ADN. También contiene al dominio PAS A el cual participa en la dimerización con ARNT y algunas otras proteínas que contengan dominios similares a PAS A con residuos hidrofóbicos, y el dominio PAS B necesario para la unión del ligando. Por último, contiene un dominio de transactivación y transrepresión ubicado en su dominio carboxilo terminal, el cual es rico en glutamina (Figura 2A).

En su estado inactivo el AHR se ubica en citosol unido a un complejo de proteínas chaperonas (Hsp90, XAP2 y p23). En presencia de sus ligandos, se une a estos generando cambios conformacionales que exponen su señal de localización nuclear, promoviendo que el AHR, junto con el complejo proteico se trasloque al núcleo. Dentro del núcleo se separa de dicho complejo proteico y dimeriza con el traslocador nuclear del AHR (ARNT, por sus siglas en inglés), lo que es necesario para unirse de manera estable al ADN, específicamente a los elementos de respuesta a xenobióticos (XREs) caracterizados por la secuencia 5'-GCGTC-3' la cual se ubica en los promotores sus genes blanco. Por otro lado, el AHR se autorregula mediante la activación de la transcripción del gen represor del AHR (AHRR, por sus siglas en inglés), el cual compite por la unión al ARNT evitando que el AHR dimerice con este último generando que migre nuevamente a citosol donde es ubiquitinado y degradado vía proteosomal (Figura 2B) [23, 24].

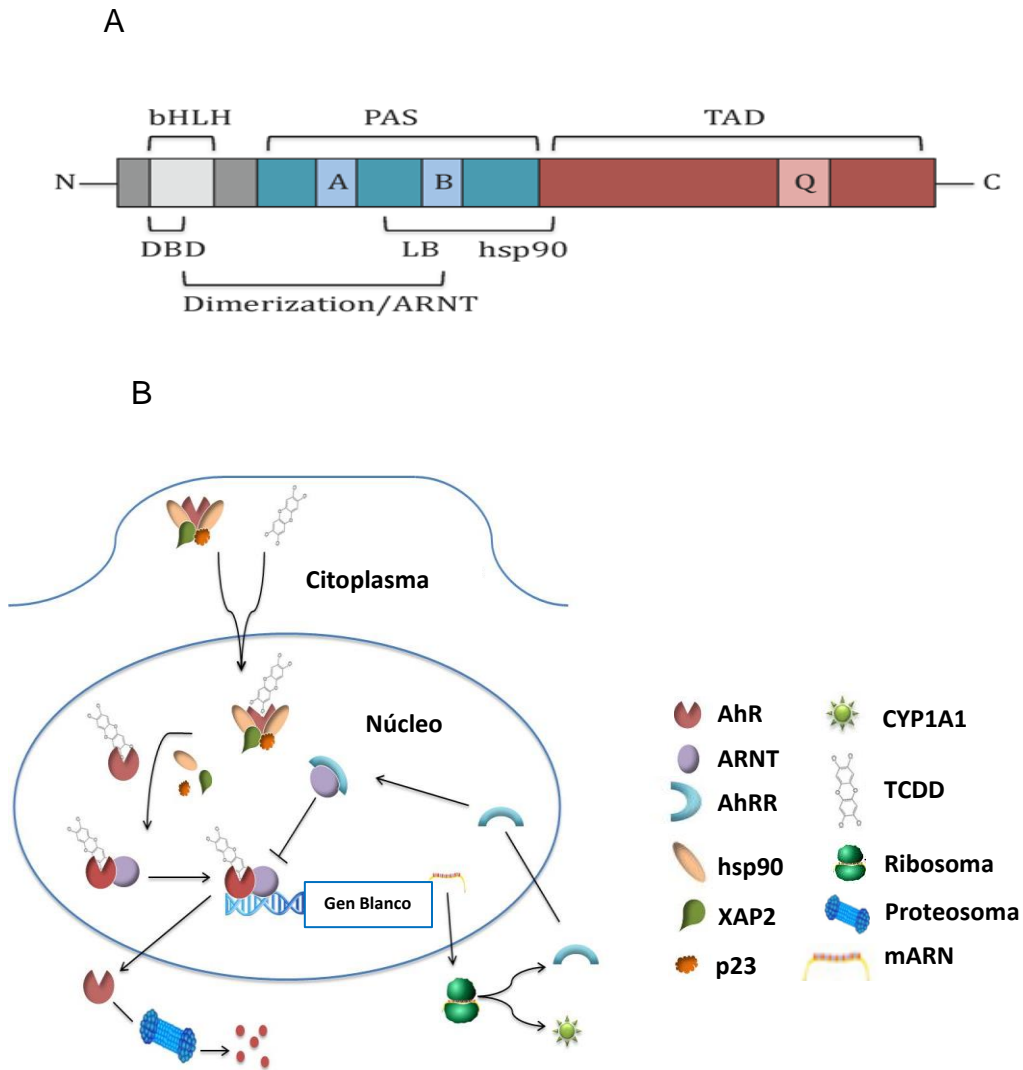


Figura 2. Estructura (A) y vía de señalización del AHR (B) [24].

De acuerdo a estudios filogénicos, el AHR apareció aproximadamente hace 550 millones de años en los primeros metazoarios. Se ha demostrado la presencia de genes ortólogos al AHR en invertebrados nemátodos, artrópodos, moluscos y en vertebrados. Sin embargo, se ha mostrado que las funciones del AHR varía de acuerdo al organismo de estudio. Por ejemplo en vertebrados se sabe que participa en el metabolismo de hidrocarburos policíclicos mientras que en varios invertebrados, se ha observado que el AHR no tiene dicha función, lo que sugiere que puede participar en otras funciones fisiológicas [25].

Además de expresarse en diferentes organismos invertebrados y vertebrados, el AHR se expresa de manera diferencial en los tejidos y órganos de mamíferos. En humanos, principalmente se expresa en placenta, hígado, pulmón, corazón y timo, entre otros (Figura 3) [26].



Figura 3. Expresión de AHR en diferentes órganos en el humano. (Human Atlas Protein)

1.3.1. Ligandos del AHR

Como previamente se mencionó, este factor de transcripción es activado por ligandos tanto exógenos como endógenos. Los ligandos con mayor afinidad hacia el AHR por lo general son moléculas hidrofóbicas y lipofílicas, con estructuras de benceno de entre uno a más anillos aromáticos, planos o co-planares, con un tamaño entre 12 a 14 Å de largo y menos de 12 Å de ancho [27].

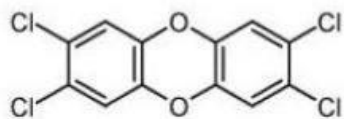
La mayoría de los ligandos exógenos son de origen antropoénico como los hidrocarburos aromáticos políciclicos (PAHs) [28], bifenilos policlorados (PCBs) y dioxinas halogenadas [29], entre otros (Figura 4). Estos compuestos son contaminantes ambientales producto de procesos de combustión o incineración de materia orgánica. La mayoría de estos ligandos actúan como agonistas del AHR, con efectos carcinogénicos y hepatotóxicos. El ligando agonista con mayor afinidad y potencia perteneciente a este grupo es el 2,3,7,8-tetraclorodibenceno-*p*-dioxina o TCDD, cuyo efecto es la activación de la transcripción de varios genes que codifican para enzimas metabolizadoras como los citocromos P450, en particular su gen canónico el *CYP1A1*.

Otros ligandos exógenos son las flavonas que se encuentran en diferentes alimentos como frutas y verduras o que pueden ser sintetizadas mediante procesos industriales con fines terapéuticos. Entre ellos, se encuentran la quercetina, galangina, genisteína, apigenina y el reverestrol. El efecto de las flavonas varía de acuerdo al tipo de flavona y a la concentración ingerida, pudiendo actuar como agonistas o antagonistas del AHR. Las flavonas con mayor actividad antagónica del AHR son la alfa-naftoflavona y el reverestrol. Se determina que actúan como antagonistas, cuando se observa una competencia en relación al efecto producido por el TCDD [30].

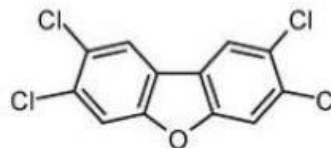
Con la generación del ratón nulo de AHR se observó que los efectos tóxicos producidos por el TCDD efectivamente eran mediados por este factor de transcripción, ya que no se observaban los cambios patológicos provocados por esta dioxina en este modelo. Adicional a estas observaciones, se apreciaron cambios importantes durante su desarrollo embrionario a nivel de hígado, bazo,

sistema linfóide, fertilidad y crecimiento normal [26, 31]. Esto sugirió que existen ligandos endógenos, los cuales participan en la activación del AHR modulando funciones fisiológicas durante el desarrollo embrionario y crecimiento normal.

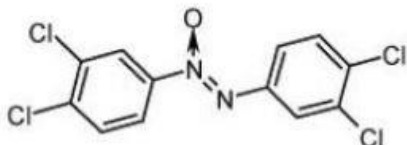
Actualmente se conocen varios ligandos endógenos del AHR que difieren estructuralmente de los ligandos exógenos, como son los metabolitos del ácido araquidónico que comúnmente tienen un efecto agonista débil. Un ejemplo claro son los eicosanoides como la lipoxina 4A. Otros metabolitos del ácido araquidónico ligandos del AHR son las prostaglandinas B₂, D₂, F_{3α}, G₂, H₁ y H₂. También los metabolitos del grupo hemo como bilirrubina, biliverdina y hemina, dentro de los cuales se ha sugerido que la bilirrubina es el agonista del AHR más potente del grupo hemo. Otros agonistas son los metabolitos del triptófano formados a partir de la vía enzimática de la indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO) como la triptamina, la kinurenina, el ácido acético indol y los productos obtenidos de triptófano cuando es sometido a luz ultravioleta como el 6-formilindol-carbazol (FICZ) con similar afinidad que el TCDD por el AHR [32, 33].



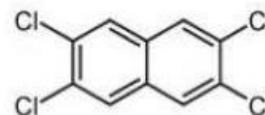
2,3,7,8-Tetraclorodibenceno-*p*-dioxina



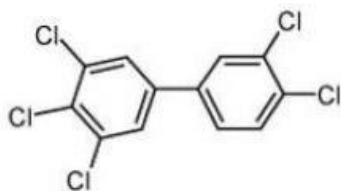
2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano



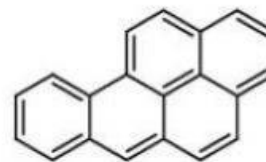
3, 3'4, 4'-Tetracloroazoxybencenodioxina



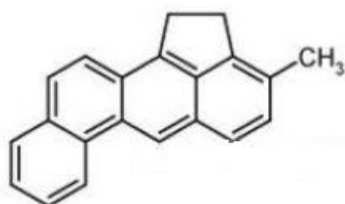
2,3,6,7-Tetracloronaftaleno



3, 3'4, 4', 5-Pentaclorobifenol



Benzo[a]pireno



3-Metilcolantreno

Figura 4. Ligandos del AHR (Wang H., Wei Y., Yu D., 2015)

1.3.2. Funciones del AHR

La función más estudiada del AHR es como regulador del metabolismo de los xenobióticos como los antes mencionados. Esta función se ha estudiado desde mediados de los años 90s, época en la que se utilizaban los hidrocarburos policíclicos para estudiar el mecanismo mediante el cual el hígado desintoxicaba y biodegradaba estos compuestos descubriendo así el importante papel que

desempeñaba el AHR en dicho proceso. Sin embargo, actualmente se han realizado investigaciones con ratones nulos de AHR o con el uso de ligandos agonistas y antagonistas para elucidar su participación en la migración y adhesión celular, así como en la endocitosis de colesterol y metabolismo de otros lípidos, degradación de proteínas, organogénesis, ciclo celular y en procesos patológicos como el cáncer [26, 34-36].

En la actualidad se están realizando estudios para conocer más acerca de la participación del AHR en la regulación del sistema inmune. Hasta el momento se ha demostrado que el AHR participa en la regulación del sistema inmune innato mediante la modulación negativa de la secreción por macrófagos de interleucinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF α , entre otras. [37]. De acuerdo a Kimura y colaboradores, el AHR interactúa con Stat1 para inhibir la cascada de señalización llevada a cabo por NF κ B y así disminuir la producción de interleucinas proinflamatorias [38]. Recientemente, estudios realizados por Domínguez-Acosta y colaboradores, demostraron que el AHR es capaz de inhibir la cascada de señalización de NF κ B mediante la ubiquitinación y promoción de la degradación vía proteosomal de RelA/p65 [39].

Por otra parte, se ha demostrado que el AHR también es capaz de modular la respuesta inmune adaptativa. De acuerdo a Quintana y colaboradores, el AHR induce la expresión del factor de transcripción FoxP3 en linfocitos T CD4⁺ lo que genera que se diferencien en linfocitos Treg, además participa en la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ en linfocitos Th17 y promueve su producción de IL-22 [40].

El AHR también disminuye la cantidad de MHC-II y la secreción de IL-6 por CD4⁺ células T, favoreciendo la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ a células Treg [41].

1.3.3. Funciones del AHR en el sistema nervioso.

Petersen S. y colaboradores en el año 2000 demostraron mediante hibridación *in situ* que el ARNm de AHR se expresan en diversas áreas del cerebro, como corteza, hipotálamo, tronco encefálico, tálamo e hipocampo [42]. Asimismo, Kimura y Tohyama en el 2017 evaluaron de la misma forma la existencia de AHR en cerebro de ratones durante diferentes etapas de su crecimiento (embrionario, joven y adultos) y observaron que existe mayor expresión de RNAm de AHR en los cerebros de ratones adultos comparado con los jóvenes, esta diferencia es más notoria en la región CA3 de hipocampo [43]. Por otro lado, Latchney y colaboradores identificaron que las células progenitoras de neuronas del hipocampo expresan *in vivo* al AHR, y participa en la neurogénesis de la misma región y en procesos de memoria [44].

El AHR está también presente en astrocitos y microglia y actúa atenuando la producción de interleucinas proinflamatorias por estas células después de ser estimuladas con IFN- α e IFN- β [45]. En este mismo contexto, en el 2008 Quintana y su grupo de investigación demostró que el AHR disminuye la inflamación y severidad de la EAE en un modelo de ratón, mediante la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ en linfocitos Treg [40]. Otra evidencia de que el AHR participa en la modulación de la inflamación en tejido nervioso son los datos de Kim y colaboradores, que indican que en un ratón nulo para el AHR, el epitelio pigmentario de retina sometido a un estímulo luminoso dañino genera una mayor inflamación comparada con el ratón silvestre caracterizada por la infiltración de microglia, depósito de inmunoglobulinas y activación de MMP [46].

Además del efecto de ligando exógenos, también se ha observado el papel que pudieran tener ligandos endógenos del AHR. En particular, la activación del AHR por su ligando endógeno FICZ es capaz de disminuir la producción de interleucinas proinflamatorias como el TNF α , en células de la microglia estimuladas con LPS [47].

2. JUSTIFICACIÓN

El AHR es un factor de transcripción activado por ligando que participa en el metabolismo de xenobióticos. Así mismo, este factor de transcripción participa en otras funciones celulares como la proliferación y diferenciación celular, transporte de lípidos y modulación de la inflamación en diferentes órganos. Debido a que en el envejecimiento ocurre una inflamación crónica y generalizada en el sistema nervioso central, específicamente en regiones como el hipocampo, resulta importante estudiar y caracterizar la expresión del AHR en relación a la edad y su posible participación en procesos de envejecimiento en tejido de hipocampo humano.

3. HIPÓTESIS

La presencia del AHR en el hipocampo del cerebro humano disminuirá con la edad en sujetos mayores de 60 años en comparación con sujetos jóvenes de 20 a 30 años.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

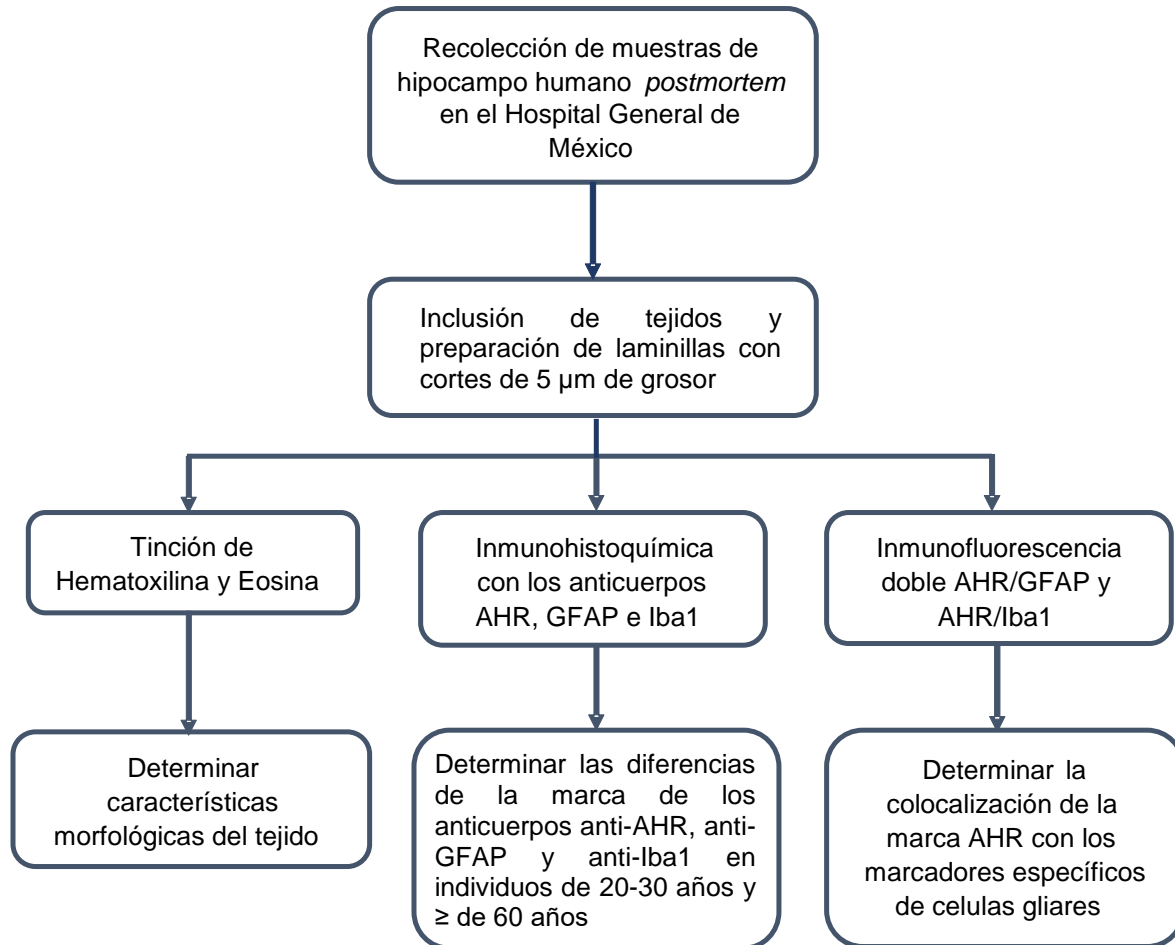
Caracterizar la presencia del AHR en los diferentes linajes celulares del hipocampo humano en muestras *postmortem* provenientes de personas adultas y jóvenes, así como determinar su relación con el proceso de envejecimiento.

4.2. Objetivos Particulares

- Verificar la integridad del tejido de hipocampo en muestras *postmortem* provenientes de personas adultas y jóvenes.
- Establecer la presencia de proteína del AHR en las muestras *postmortem* provenientes de personas adultas y jóvenes.
- Determinar la localización de la proteína AHR en los astrocitos y microglia de hipocampo humano de muestras *postmortem* de diferentes edades.

5. MÉTODOS

5.1. Diseño experimental



5.2. Muestras de hipocampo

Se utilizaron trece muestras de hipocampo humano izquierdo siete pertenecientes a la edad de entre 20 a 30 años (3 hombres y 4 mujeres) y seis pertenecientes a mayores de 60 años de edad (3 hombres y 3 mujeres), recolectadas en el Hospital General de México “Eduardo Liceaga”. Para ello se obtuvieron los consentimientos informados con los familiares de los individuos y se siguieron los siguientes criterios de selección:

Criterios de inclusión:

- 1) Individuos de entre 20 a >60 años de edad.
- 2) Contar con expediente y causa de defunción definida.
- 3) Hipocampo izquierdo íntegro.

Criterios de exclusión:

- 1) Procesos infecciosos sistémicos.
- 2) Procesos inflamatorios sistémicos.
- 3) Procesos neoplásicos sistémicos.
- 4) Enfermedades o anomalías macroscópicas en el cerebro.

Para la obtención de las muestras se siguió el protocolo del Hospital General el cual consistió en realizar la extracción del cerebro de los cuerpos, los cuales se mantuvieron en un cuarto frío a -4 °C, 4 h posteriores a la defunción. Una vez obtenido el cerebro, este se fijó mediante la colocación del mismo en formol al 10% durante una semana, para posteriormente realizar el corte del encéfalo y obtener el hipocampo de lado izquierdo.

A continuación, se presenta la tabla con el folio de expediente, sexo y edad de los pacientes de los cuales se obtuvo la muestra de hipocampo.

Tabla 1. Sexo y edad de los pacientes.

Folio	Sexo	Edad
16 277	Masculino	23 años
16 148	Masculino	28 años
16 264	Masculino	30 años
15 371	Femenino	18 años
17 135	Femenino	26 años
16 150	Femenino	27 años
15 390	Femenino	30 años
15 306	Masculino	70 años
16 340	Masculino	72 años
16 080	Masculino	75 años
16 390	Femenino	65 años
16 309	Femenino	89 años
15 284	Femenino	94 años

5.3. Inclusión de tejidos y preparación de laminillas

Los hipocampos recopilados se colocaron en cassettes y se lavaron bajo flujo continuo de agua corriente durante 30 min para desplazar el formol de los tejidos. Posteriormente, se procedió a deshidratar los tejidos con la siguiente secuencia: xilol, xilol, alcohol absoluto, alcohol absoluto, alcohol 96%, alcohol 96%, alcohol 80%, alcohol 80%, alcohol 70%, alcohol 70%, durante 5 min en cada solución. Después se embebieron en dos parafinas líquidas durante 1 h en cada una y por último se incluyó en parafina rígida. Finalmente, los bloques de parafina fueron cortados en un micrótopo Reichert-Jung 820II con un grosor de 5 μ m y montados en portaobjetos pretratados con Poli-L lisina para mejorar la adhesión de los tejidos.

5.4. Tinción de Hematoxilina y Eosina

Principio: La tinción de hematoxilina y eosina se utiliza para observar las características morfológicas de un tejido, ya que permite diferenciar o identificar las diferencias entre núcleo y citoplasma, así como diferencias entre tejidos. Lo anterior se debe a que la hematoxilina por ser catiónica o básica tiñe estructuras ácidas como el ADN de color morado y la eosina tiñe componentes aniónicos o ácidos como organelos, filamentos intermedios entre otras estructuras de color rosa.

Procedimiento: La tinción de hematoxilina y eosina se realizó con el fin de observar las características morfológicas del tejido y su integridad. Para ello se desparafinaron los tejidos con la secuencia xilol, xilol, alcohol absoluto, alcohol absoluto, alcohol 96%, alcohol 80%, alcohol 70% y agua corriente, se sumergió durante 1 min en hematoxilina y posteriormente en agua amoniacal al 0.3%, seguido de agua destilada, y eosina durante 5 min. Finalmente se volvió a deshidratar con un tren de alcoholes y xiloles y se montó en resina Entellan Merck (HX73142061). Se visualizaron los cortes en un microscopio Leica de campo claro, a un aumento de 20X y 40X.

5.5. Inmunohistoquímica

Principio: La inmunohistoquímica es una técnica empleada para marcar, amplificar y hacer visible una proteína celular para determinar su presencia, localización y nivel de expresión. Para ello se utilizan anticuerpos primarios dirigidos hacia la proteína de interés, posteriormente se utilizan anticuerpos secundarios unidos a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) que se adhieran al anticuerpo primario previamente usado. Una vez unido el anticuerpo primario a la proteína específica, y el anticuerpo secundario al primario, se hace reaccionar a la HRP mediante la adición de un sustrato el cual genera un producto observable.

Procedimiento: Se desparafinaron los cortes de la misma manera que en la tinción de hematoxilina y eosina. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS. Al finalizar los lavados se llevó a cabo la recuperación antigénica con Buffer de Citratos

pH 6, seguido de 3 lavados, se bloquearon las peroxidasas endógenas con peróxido al 0.3% y nuevamente se llevaron a cabo 3 lavados. Se realizó el bloqueo con albúmina sérica bovina al 5% durante 1 h, se incubó anticuerpo primario GFAP 1/500 (Dako, Z0334, Santa Clara CA, USA), AHR 1/50 (Abcam, 2770 San Francisco, USA), Iba1 1/200 (Abcam, [EPR6136(2)], San Francisco), durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS, se incubó el anticuerpo secundario anti-ratón 1/400 (Invitrogen) y anti-conejo 1/400 (Cell-Signaling, Massachusetts, USA) ligado a HRP durante 2 h a temperatura ambiente. Nuevamente se llevaron a cabo 3 lavados y por último se reveló con Diaminobenzidina (0.006 g en 10 ml de PBS-Tritón, Sigma-Aldrich). Se deshidrataron con una secuencia de alcoholes hasta llegar a Xilol y se montaron con la resina Entellan Merck (HX73142061). Los cortes se visualizaron en un microscopio Leica de campo claro a un aumento de 20X y 40X.

5.6. Inmunofluorescencia:

Principio: La técnica de inmunofluorescencia es un inmunoensayo el cual se emplea con el fin de demostrar la presencia, nivel, interacción, ubicación de una proteína de interés a nivel celular. La ventaja de la inmunofluorescencia sobre la inmunohistoquímica es la posibilidad de marcar más de una proteína al mismo tiempo y poder diferenciar el marcaje entre ellas. Se utiliza un anticuerpo primario que se adhiere a la proteína de interés y un anticuerpo secundario que contiene adherido un fluoróforo, el cual al ser expuesto a un haz de luz de longitud de onda corta es excitado lo que resulta en la emisión de luz de una longitud de onda más larga. Esta señal puede ser observada y cuantificada mediante microscopía de fluorescencia.

Procedimiento: Se desparafinaron los tejidos como se mencionó previamente. Se realizaron 3 lavados, seguido de recuperación antigénica con Buffer de Citratos pH 6. Nuevamente se llevaron a cabo 3 lavados, se realizó el apagado de autofluorescencia mediante el tratamiento con sudan negro (diluído en alcohol 70%) 10 min, seguido de 3 lavados para retirar los excesos. Se bloqueó durante una h

con albúmina sérica bovina al 5%, después se incubó con anticuerpo primario GFAP 1/500 (Dako, Z0334, Santa Clara CA, USA), AHR 1/50 (Abcam, 2770 San Francisco, USA), Iba1 1/200 (Abcam, [EPR6136(2)], San Francisco) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados, seguido de una incubación con anticuerpo secundario (Jackson laboratorios FITC, donado por el Dr. Francisco García Sierra, Lab. 20, Biol. Cel. CINVESTAV) anti-ratón IgG 1/500, (Jackson laboratories TRITC, Francisco García Sierra, Lab. 20, Biol. Cel. CINVESTAV) anti-conejo 1/500 durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados y finalmente se montaron en Vectashield con DAPI. Los cortes se visualizaron en un microscopio Leica de epifluorescencia, a un aumento de 20X y 40X.

5.7. Análisis estadístico

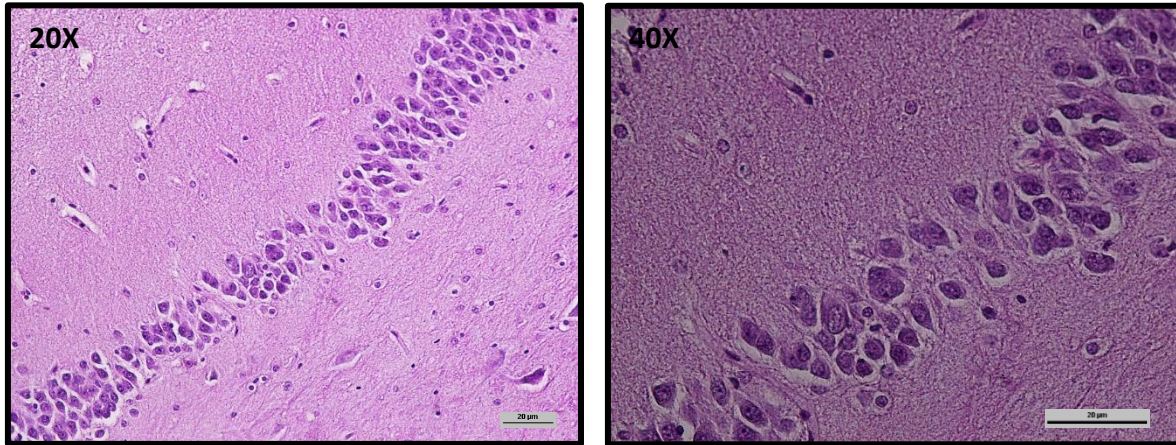
Para la cuantificación de la marca se utilizó el programa ImageJ(2). Se cuantificó el área total de la marca del GFAP en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. En el caso del AHR se cuantificó mediante número de células con marca para el AHR/número de células totales en las regiones CA1 y CA3 de hipocampo. En los casos anteriores, se tomaron 5 fotos de campos aledaños en un área total de 17 milímetros cuadrados, de las regiones CA1 y CA3 en tres cortes de cada muestra de hipocampo de adultos mayores de 60 años y de jóvenes de 20 a 30 años. Para la microglia se cuantificó el número de células con morfología de microglia marcadas con el anticuerpo Iba1 en un corte correspondiente a un individuo joven de 30 años y un adulto mayor de 94 años. Para todas las cuantificaciones de GFAP y AHR se realizó un promedio del valor obtenido de las tres evaluaciones por muestra y al final un promedio de los resultados obtenidos de las muestras jóvenes y un promedio de los resultados obtenidos de los individuos mayores de 60 años. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el software SigmaPlot 11.0, mediante una t de Student. Se consideró para diferencias significativas a una $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Integridad del tejido

Primero se evaluó la integridad del tejido mediante la tinción de hematoxilina y eosina para saber si se contaba con la zona específica sobre la que se llevarían a cabo los análisis, el hipocampo, así como la integridad requerida para realizar el presente estudio. Como se puede observar en las figuras 5 y 6, existe una adecuada absorción de los pigmentos, pudiéndose identificar los núcleos celulares en morado y el citoplasma en rosa. Además, se delimita adecuadamente la zona CA1 y CA3 de hipocampo mediante la observación de los núcleos de las neuronas correspondientes a estas áreas. No se observan inclusiones proteicas en el tejido, ni células con características de apoptosis. Por otro lado, se observa el tejido íntegro, sin ruptura o alguna otra anomalía. Por lo tanto, el tejido se encuentra íntegro, bien preservado y sin anomalías observables.

Paciente de 28 años



Paciente de 80 años

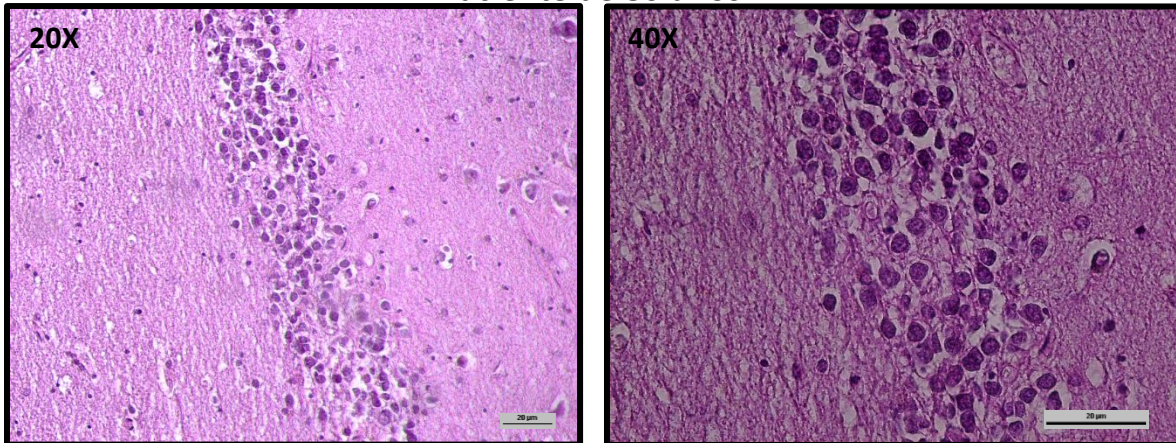
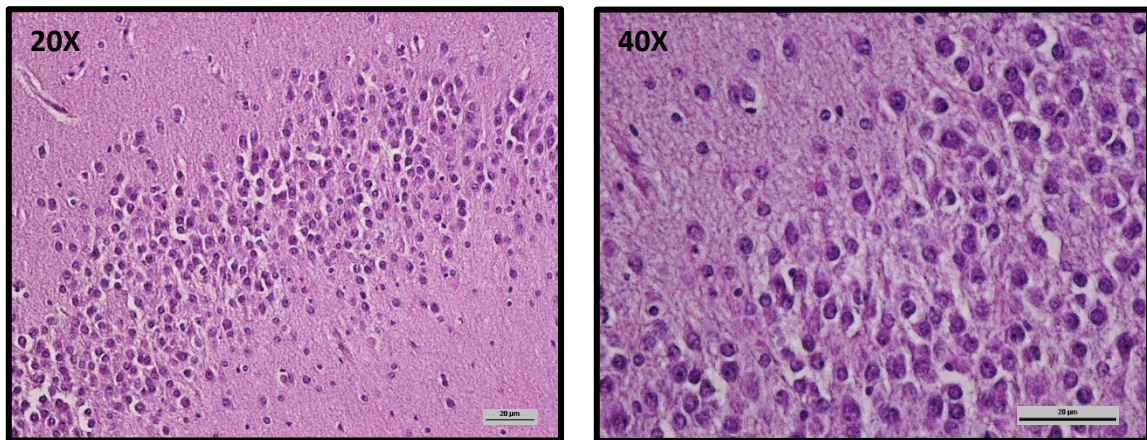


Figura 5. Integridad del tejido de hipocampo, región CA1. Los cortes de tejido fueron teñidos con tinción de hematoxilina y eosina. En las imágenes de la izquierda a un aumento de 20X y a la derecha a un aumento del mismo campo a 40X. A) Muestra representativa del grupo de jóvenes. B) Muestra representativa del grupo de mayores de 60 años.

Paciente de 28 años



Paciente de 80 años

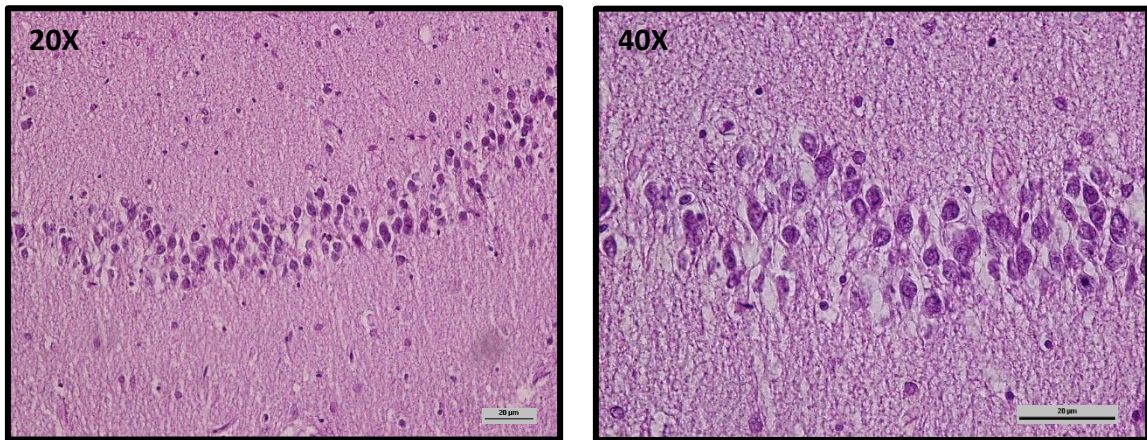


Figura 6. Integridad del tejido de hipocampo, región CA3. Los cortes de tejido fueron teñidos con tinción de hematoxilina y eosina. En las imágenes de la izquierda a un aumento de 20X y a la derecha a un aumento del mismo campo a 40X. A) Muestra representativa del grupo de jóvenes. B) Muestra representativa del grupo de mayores de 60 años.

6.2. Células gliales reactivas.

Como se mencionó previamente, durante el envejecimiento los astrocitos presentan gliosis reactiva, caracterizada por una hipertrofia y un aumento en la

expresión de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP). Por otro lado, las células de la microglia proliferan y presentan cambios morfológicos. Por lo anterior se procedió a realizar las inmunohistoquímicas con los marcadores GFAP e Iba1 para corroborar el envejecimiento o estado de senescencia de las muestras del grupo de mayores de 60 años, comparado con las muestras del grupo de 20-30 años.

Como se observa en las figuras 7 y 8, existe un aumento en la expresión de GFAP tanto en la región CA1, como en la región CA3 en los tejidos de hipocampo humano del grupo de mayores de 60 años, comparado con los hipocampos del grupo de 20-30 años.

Posteriormente se llevó a cabo la identificación de las células de microglia mediante el uso del anticuerpo Iba1. Como se puede observar en las figuras 9 y 10, existe una tendencia en el aumento de células de microglia en las regiones CA1 y CA3 de hipocampos provenientes del grupo de >60 años comparado con hipocampos del grupo de jóvenes de 20-30 años.

Con los resultados anteriores se puede aseverar que los tejidos del grupo de personas mayores de 60 años presentan un aumento en la expresión del GFAP y un probable aumento de células de la, características que se encuentran presentes durante el envejecimiento.

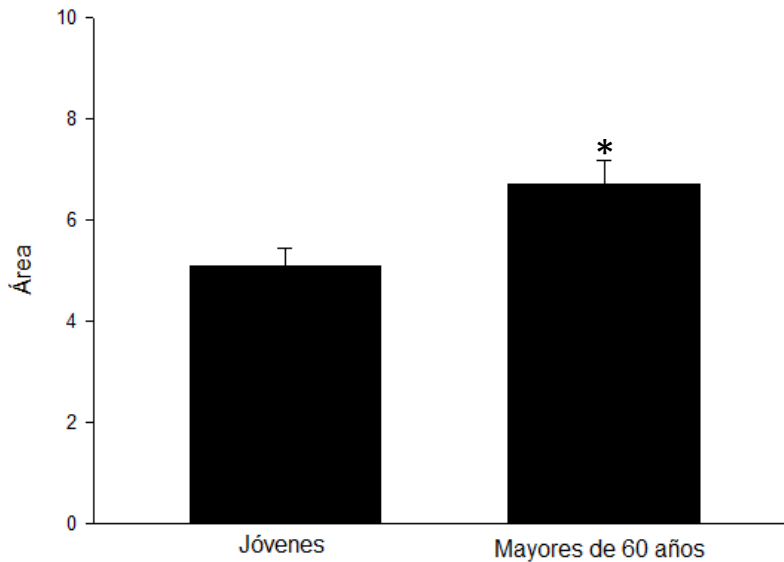
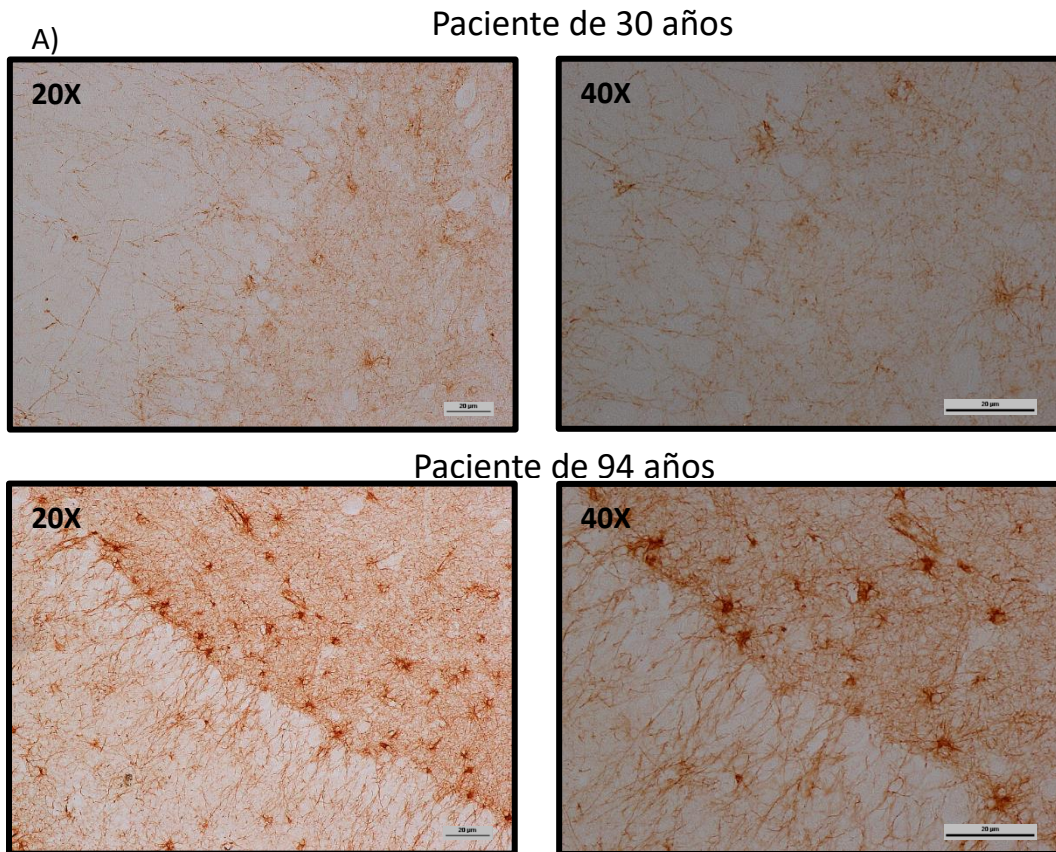


Figura 7. Expresión de GFAP en la región CA1 del hipocampo humano. Se realizaron IHQs en los tejidos de hipocampo humano del grupo de jóvenes de 20-30 años y del grupo de mayores de 60 años con el marcador específico para astrocitos GFAP. A) Fotografías representativas de la señal de GFAP en la región CA1 de hipocampo de ambos grupos. Paneles izquierdos a un aumento de 20X y paneles derechos a un aumento de 40X. B) Cuantificación de la expresión de GFAP en la región CA1 de hipocampo de ambos grupos. Los datos representan el promedio de las evaluaciones realizadas por triplicado de 7 muestras provenientes del grupo de 20-30 años y 6 muestras provenientes del grupo mayor de 60 años. * $p < 0.05$

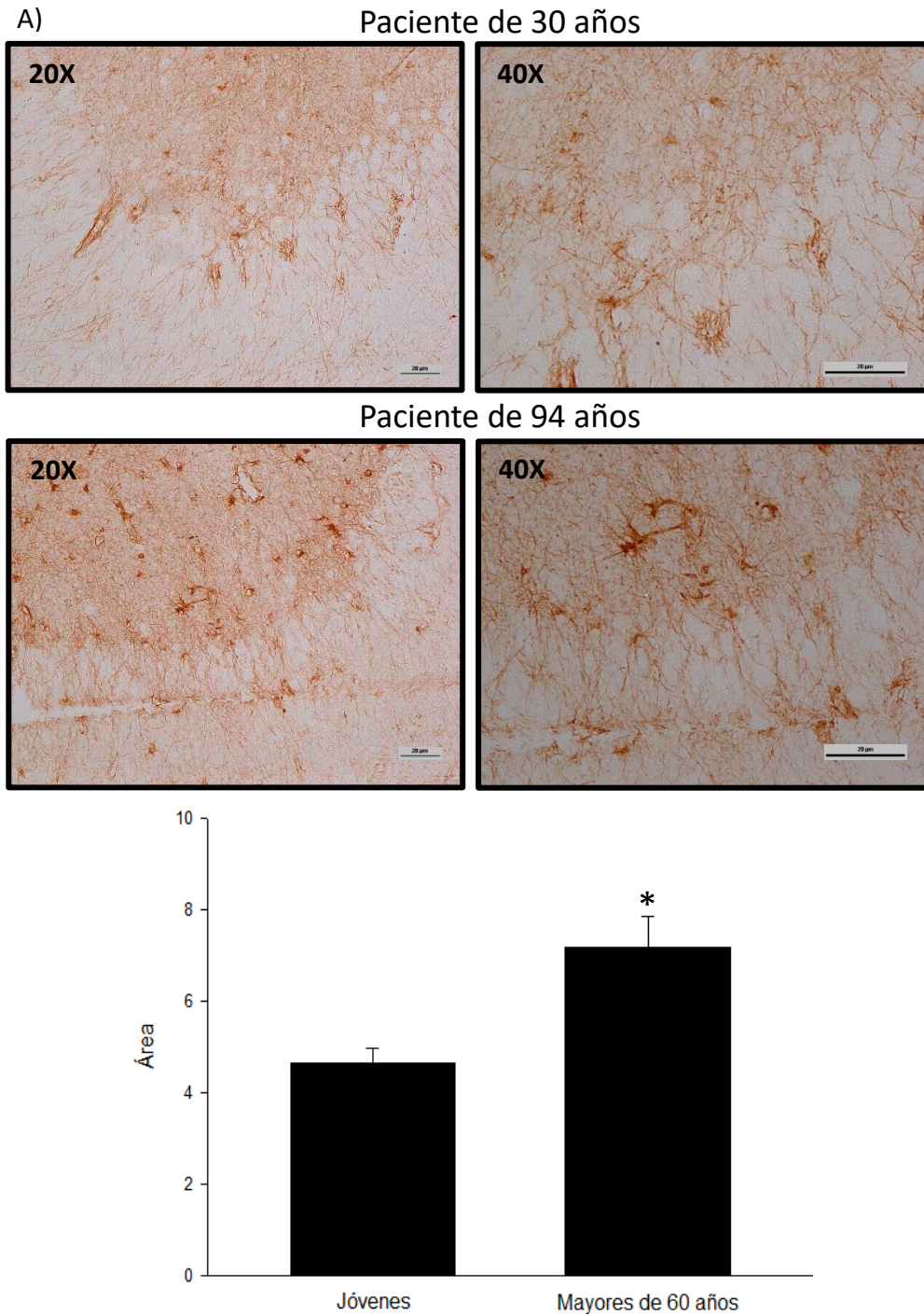


Figura 8. Expresión de GFAP en la región CA3 del hipocampo humano. Se realizaron IHQs en los tejidos de hipocampo humano del grupo de jóvenes de 20-30 años y del grupo de mayores de 60 años con el marcador específico para astrocitos GFAP. A) Fotografías representativas de la señal de GFAP en la región CA3 de hipocampo de ambos grupos. Paneles izquierdos a un aumento de 20X y paneles derechos a un aumento de 40X. B) Cuantificación de la expresión de GFAP en la región CA3 de hipocampo de ambos grupos. Los datos representan el promedio de las evaluaciones realizadas por triplicado de 7 muestras provenientes del grupo de 20-30 años y 6 muestras provenientes del grupo mayor de 60 años. ** $p < 0.05$

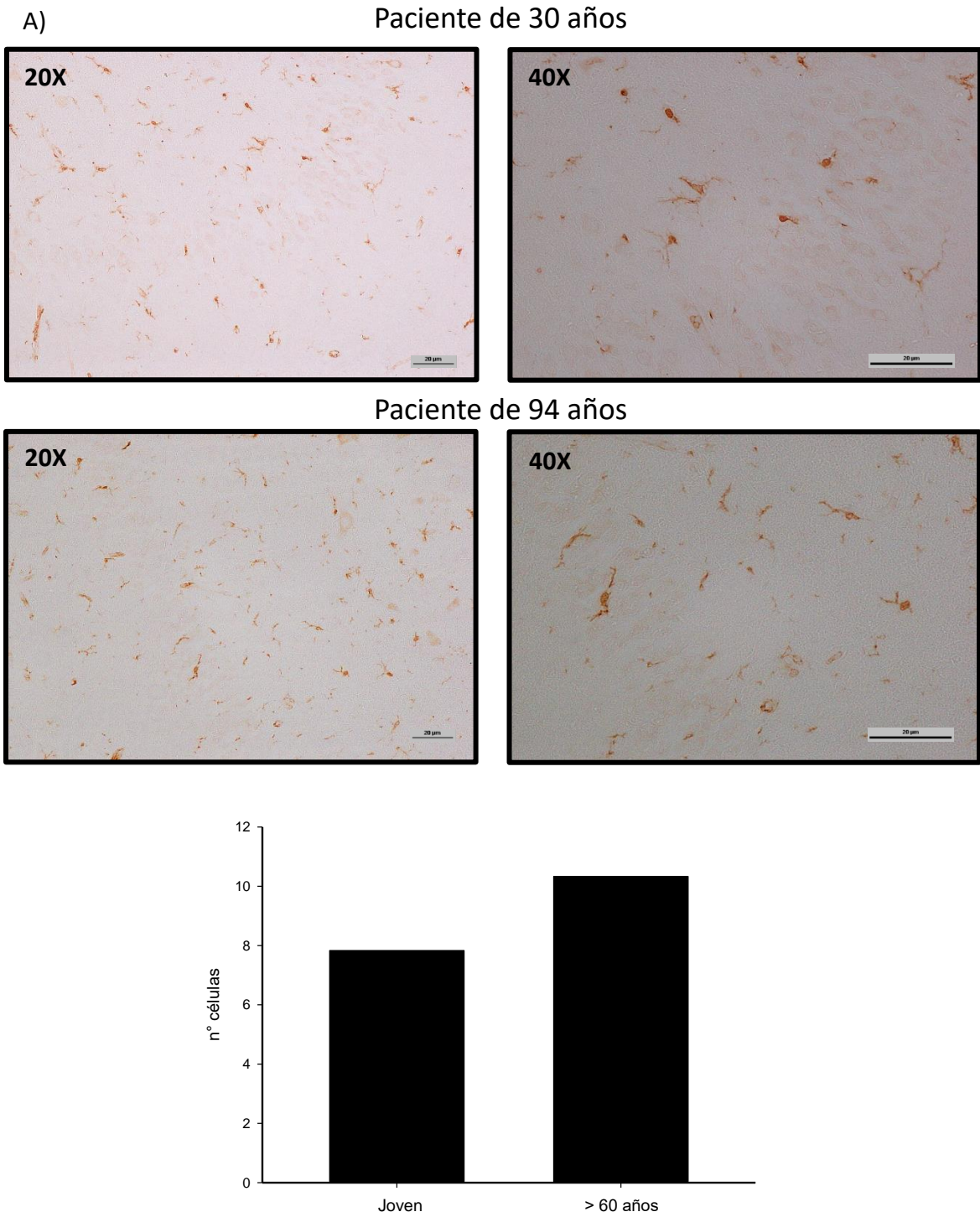


Figura 9. Expresión de Iba1 en la región CA1 de hipocampo humano. Se realizaron IHQs en los tejidos de hipocampo humano provenientes tanto del grupo de 20-30 años como del grupo de >60 años con el marcador específico de microglia activa Iba1. A) Fotografías representativas de la señal de Iba1 en la región CA1 de hipocampo de ambos grupos. Paneles izquierdos a un aumento de 20X y paneles derechos a un aumento de 40X. B) Cuantificación de la expresión de células marcadas con Iba1 en la región CA1 de hipocampo de ambos grupos. Los datos representan la evaluación realizada en una muestra correspondiente a cada grupo, de 20-30 años y del grupo mayor de 60 años.

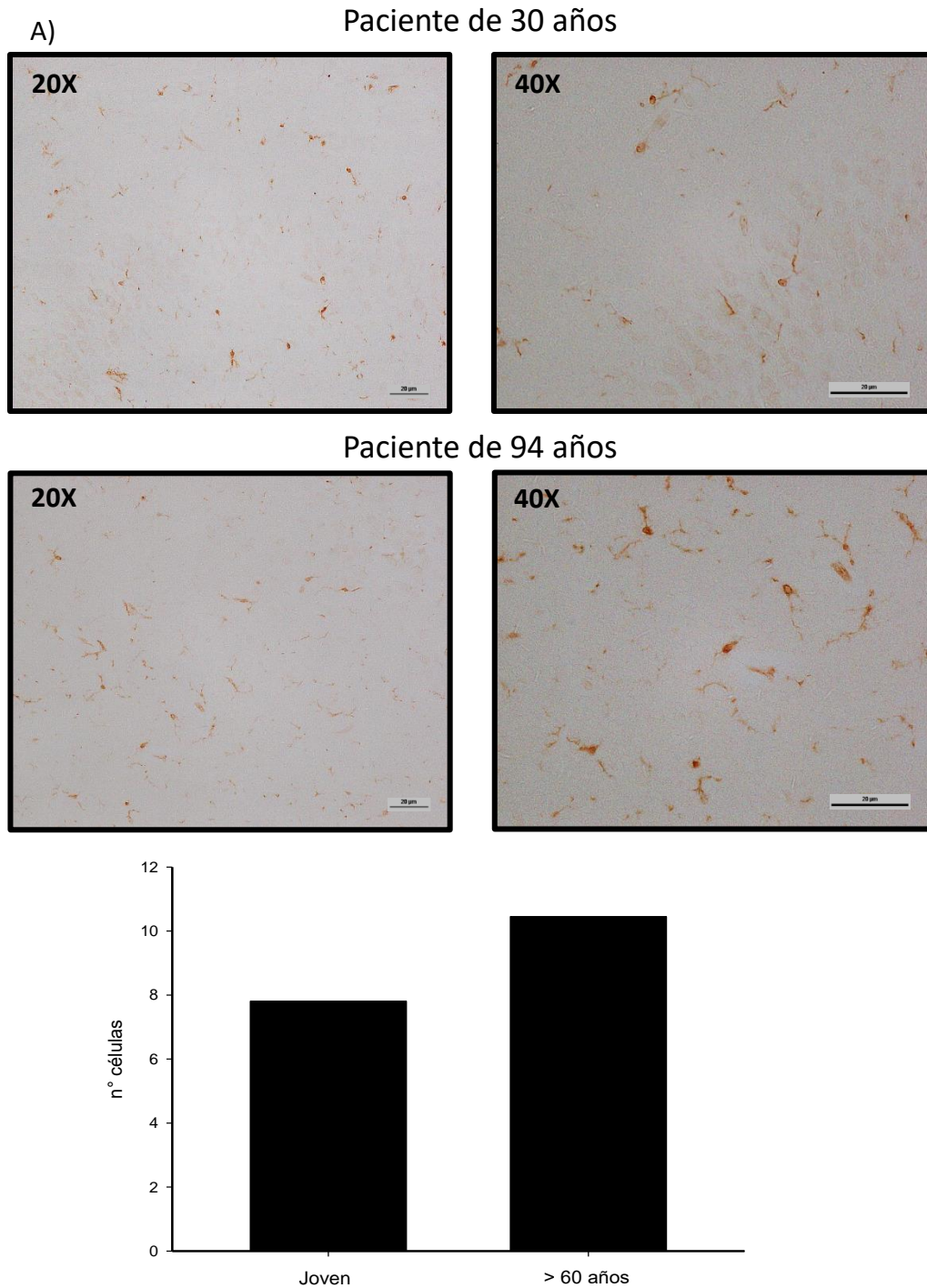


Figura 10. Expresión de Iba1 en la región CA3 de hipocampo humano. Se realizaron IHQs en los tejidos de hipocampo humano provenientes tanto del grupo de 20-30 años como del grupo de >60 años con el marcador específico de microglia activa Iba1. A) Fotografías representativas de la señal de Iba1 en la región CA3 de hipocampo de ambos grupos. Paneles izquierdos a un aumento de 20X y paneles derechos a un aumento de 40X. B) Cuantificación de la expresión de células marcadas con Iba1 en la región CA3 de hipocampo de ambos grupos. Los datos representan la evaluación realizada en una muestra correspondiente a cada grupo, de 20-30 años y del grupo mayor de 60 años.

6.3. Expresión de AHR en hipocampo humano

Posteriormente, se procedió a estandarizar y evaluar el funcionamiento del anticuerpo dirigido hacia AHR en tejido de hígado de ratón C57BL/6. Como se puede observar en la figura 11, la marca del AHR es citoplasmática y abundante en células hepáticas. No se observa marca fuera de las células, ni precipitados. De lo anterior se puede deducir que el anticuerpo es funcional y existe una abundante marca citoplasmática de AHR en el hígado de ratón C57BL/6.

Marca del anticuerpo AHR en hígado de ratón

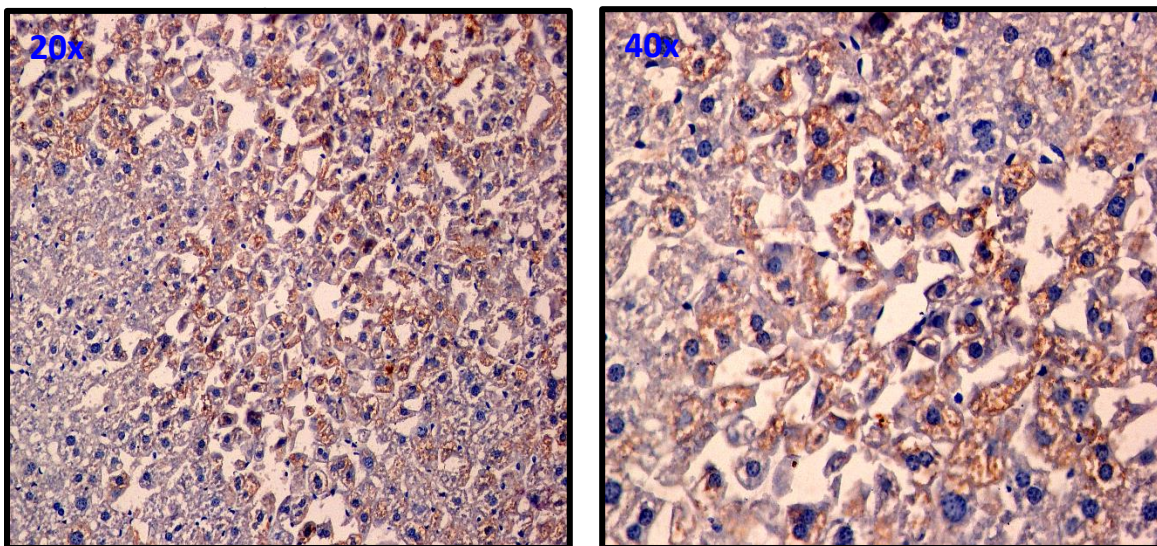


Figura 11. Expresión del AHR en el hígado de ratón. Para la visualización del AHR se realizaron IHQs del tejido hepático de ratón C57BL/6 con un anticuerpo dirigido contra el AHR (café). Así mismo, las muestras también se tiñeron con hematoxilina (azul) para contrastar los núcleos celulares.

Después de haber estandarizado la técnica de IHQ para detectar al AHR, se procedió a realizar las IHQs en los tejidos de hipocampo humano. Una vez realizada la IHQ en todos los cortes, se realizó una cuantificación semiautomática en el programa ImageJ 2.0, así como el análisis estadístico. En las figuras 12 y 13 se observa que existe una diferencia significativa en la expresión del AHR entre el grupo de jóvenes de 20-30 años y el grupo de >60 años en tejido de hipocampo humano en las áreas de CA1 y CA3, con un aumento en la expresión de este factor de transcripción en el segundo grupo con respecto al primero.

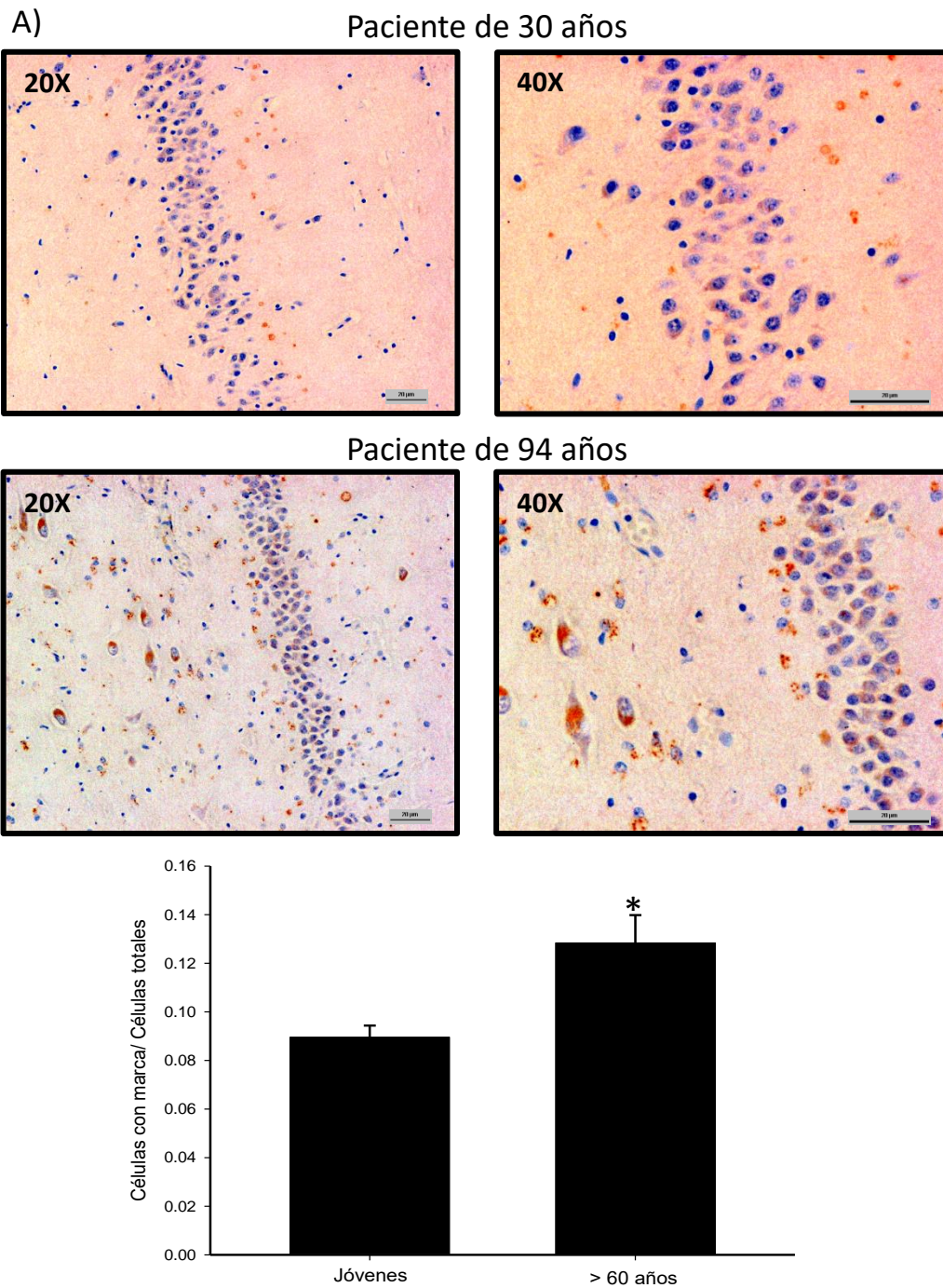


Figura 12. Expresión de AHR en la región CA1 del hipocampo humano. Se realizaron IHQs en los tejidos de hipocampo humano provenientes tanto del grupo de 20-30 años como del grupo de >60 años con el anticuerpo contra AHR. A) Fotografías representativas de la señal de AHR en la región CA1 de hipocampo de ambos grupos. Paneles izquierdos a un aumento de 20X y paneles derechos a un aumento de 40X. B) Cuantificación de la expresión de células con señal de AHR en la región CA1 de hipocampo de ambos grupos. Los datos representan el promedio de las evaluaciones realizadas por triplicado de 7 muestras provenientes del grupo de 20-30 años y 6 muestras provenientes del grupo mayor de 60 años. * $p < 0.05$.

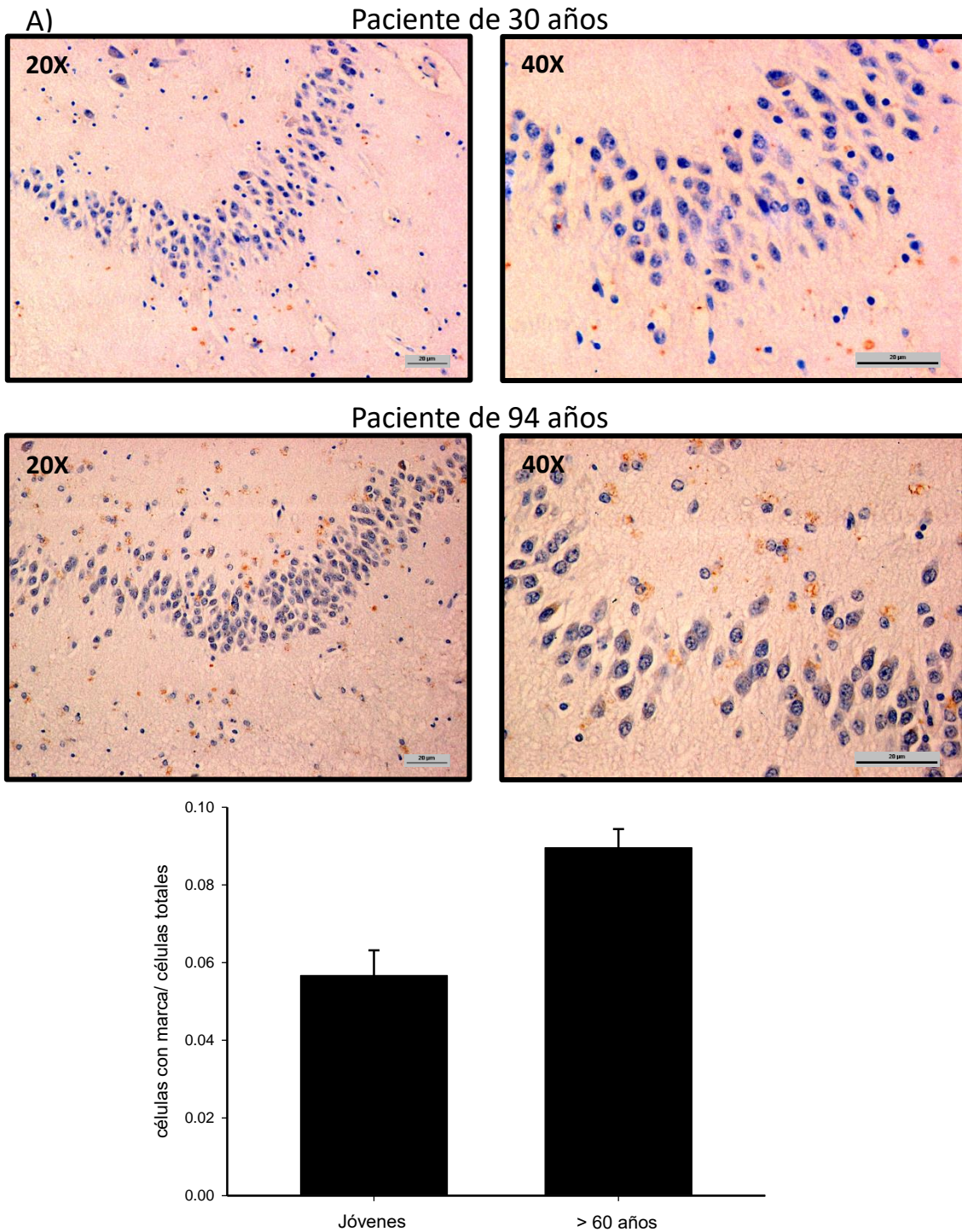


Figura 13. Expresión de AHR en la región CA3 del hipocampo humano. Se realizaron IHQs en los tejidos de hipocampo humano provenientes tanto del grupo de 20-30 años como del grupo de >60 años con el anticuerpo contra AHR. A) Fotografías representativas de la señal de AHR en la región CA3 de hipocampo de ambos grupos. Paneles izquierdos a un aumento de 20X y paneles derechos a un aumento de 40X. B) Cuantificación de la expresión de células con señal de AHR en la región CA3 de hipocampo de ambos grupos. Los datos representan el promedio de las evaluaciones realizadas por triplicado de 7 muestras provenientes del grupo de 20-30 años y 6 muestras provenientes del grupo mayor de 60 años. * $p < 0.05$.

6.4. Expresión del AHR en células gliares

Debido a que las principales células que participan en la producción y modulación de la neuroinflamación durante el envejecimiento o a través de un proceso traumático o infeccioso son las células gliares, astrocitos y microglia, nuestro siguiente objetivo fue evaluar la expresión del AHR en estos tipos celulares. Para ello, se realizaron inmunofluorescencias dobles AHR/GFAP y AHR/Iba1 en el hipocampo de un paciente de 94 años (debido a que se encontró mayor cantidad de AHR en esta muestra) para observar la presencia de AHR tanto en astrocitos como en microglia. Como se puede apreciar en la figura 14, el AHR se expresa en astrocitos. La morfología de la marca del AHR es similar a la observada en las IHQs la cual se delimita en un espacio dentro del citoplasma de los astrocitos, con una aparente morfología de estar contenida en vesículas.

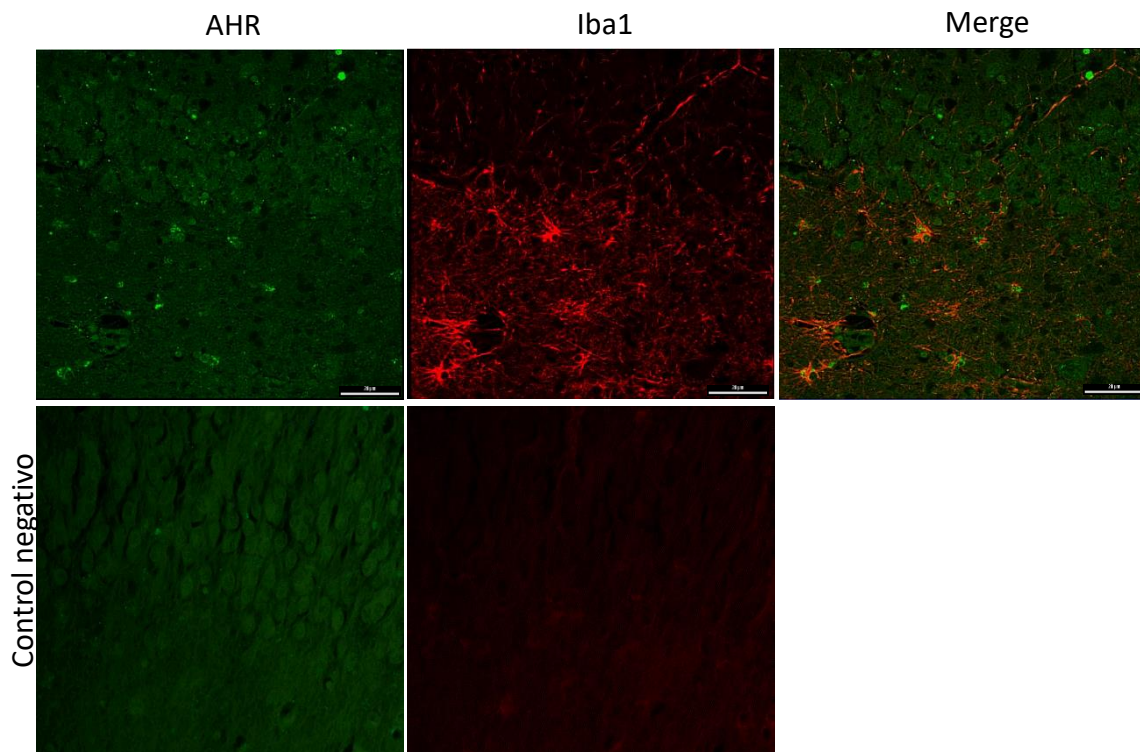


Figura 14. Expresión de AHR en astrocitos. Se realizó una inmunofluorescencia doble con los anticuerpos para AHR (A, en verde) y los anticuerpos para GFAP (B, en rojo). Merge (C). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal.

Por otro lado, en la figura 15 se puede observar que el AHR se expresa en microglía. Se aprecia una colocalización entre la marca del AHR e Iba1 vista como color amarillo en el merge de los dos canales.

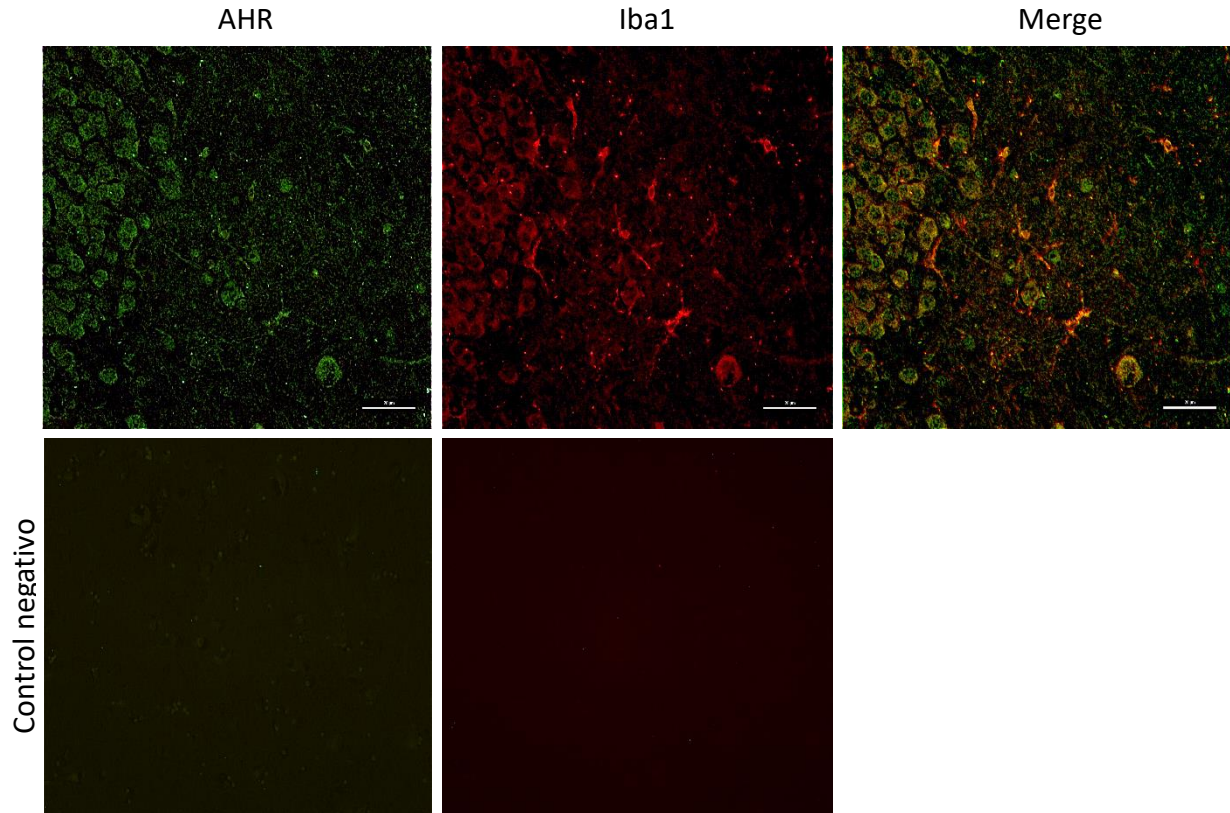


Figura 15. Expresión de AHR en microglía. Se realizó una inmunofluorescencia doble con los anticuerpos para AHR (A, en verde) y los anticuerpos para Iba1 (B, en rojo). Merge (C). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal.

7. DISCUSIÓN

El envejecimiento es la acumulación de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo, que como característica principal es la presencia de una inflamación leve pero persistente que lleva a un descenso de las capacidades físicas y mentales y un aumento en el riesgo de aparición de enfermedades. Por otro lado, el AHR es un factor de transcripción que participa en el metabolismo de xenobióticos, proliferación y diferenciación celular y en la regulación de la respuesta inmune modulándola negativamente.

En estudios recientes realizados en modelos *in vitro* e *in vivo*, se ha observado que el AHR tiene una participación durante el proceso de envejecimiento. Con el avance de la edad, se presentan cambios en sus niveles de expresión con una tendencia a disminuir la cantidad de la proteína en la retina [48] y en el sistema linfhemático [49]. En este proyecto se evaluó si existían modificaciones en el nivel de expresión a nivel de la proteína del AHR en hipocampos de humanos de edades entre 20 y 30 años y mayores de 60 años. Nuestros resultados muestran que existe un aumento significativo de la expresión del AHR en el hipocampo de personas mayores de 60 años, comparado con los hipocampos de personas jóvenes de entre 20 y 30 años. En contraste con estos resultados, Bravo-Ferrer y colaboradores observaron en un modelo *in vivo* que los niveles del *ahr* disminuyen en ratones envejecidos comparado con ratones jóvenes (Resultados mostrados en congreso “AHR meeting”, Paris, France, 2018). Además, ratones *ahr*-nulos, presentan cambios característicos del envejecimiento a temprana edad. Estos resultados no concuerdan con nuestros hallazgos; sin embargo, en un estudio realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía se observó que existe un aumento en los niveles de proteína del AHR en sueros de pacientes mayores de 60 años con demencia, pero sin cambios significativos entre jóvenes y mayores de 60 años (estudios realizados por nuestro grupo de investigación aún no publicados).

En este mismo contexto, cabe resaltar que existen diferencias en cuanto potencia y afinidad del AHR por sus ligandos entre especies e incluso entre cepas

de una misma especie. Por ejemplo, en ratón, la cepa C57BL/6 expresa un ahr cuya afinidad por el TCDD es mucha mayor comparada con la que presenta el ratón D2 (Poland et. Al., 1974). Además de diferencias en la afinidad por sus ligandos, también se han observado diferencias entre especies en relación a sus genes blanco y la potencia con la que induce sus expresiones. Flaveny y colaboradores demostraron, en fibroblastos, que cuando el AHR de humano es activado con TCDD se expresan principalmente genes relacionados con la respuesta inmune y proliferación celular, mientras que la activación del ahr de ratón promueve principalmente la expresión de genes relacionados al metabolismo de lípidos y transporte de proteínas [50]. Estas diferencias podrían explicar, al menos parcialmente, las observaciones del presente estudio con las reportadas en ratón.

Por otro lado, se observó la presencia del AHR en células de la microglia probablemente reactiva, correspondientes a los macrófagos o células del sistema inmune del sistema nervioso central. Esto concuerda con los hallazgos reportados por Lee y colaboradores en el 2015, donde observaron, en ratón, la expresión del ahr en células de microglia después de haber sido estimuladas con su ligando FICZ. Además, reportan que la activación del ahr previene un aumento en la secreción de interleucinas proinflamatorias en ratones inoculados en el SNC con LPS [51]. En este trabajo también se observó la expresión del AHR en astrocitos de hipocampo. Aunque no todos los astrocitos expresan al AHR, aquellos que sí, lo presentan en el citoplasma de las células. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de Frik en el 2018 donde demuestran que después de una lesión traumática en cerebro de ratones silvestres, el ahr se expresa en los astrocitos. Sin embargo, también mencionan que la marca se encuentra principalmente en el núcleo [52] contrario a nuestro resultado que indica una localización citoplásmica. Cabe resaltar que nuestras muestras no fueron sometidas a ningún estímulo inflamatorio o al estímulo de un ligando agonista del AHR, como en los artículos discutidos anteriormente. Es posible entonces, que se requiera de un estímulo, como una infección o traumatismo que resulte en una inflamación aguda que a su vez promueva la internalización del AHR al núcleo. Como se mencionó previamente, durante el envejecimiento existe una inflamación crónica

caracterizada por la presencia de interleucinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF α , entre otras. En este mismo contexto, se ha demostrado en modelos animales que la IL-1 β [53], TNF α e IFN- γ [54], entre otras citocinas, tienen la capacidad de aumentar la concentración de la kinurenina, un ligando endógeno del AHR, a través de inducir la expresión de laIDO y la TDO, las enzimas encargadas de sintetizarla. Coincidente con estas observaciones, un estudio realizado por Kepplinger y colaboradores demostró que en personas mayores de 50 años existen niveles elevados de kinurenina en líquido cefaloraquídeo comparados con individuos menores de 50 años [55]. Además, se han observado niveles elevados de las enzimasIDO y TDO en personas mayores de 60 años y en personas con enfermedades neurodegenerativas asociadas con la edad como la enfermedad de Alzheimer [56]. Considerando lo anterior, es posible que el ambiente proinflamatorio característico del envejecimiento favorezca un aumento de la síntesis del ligando endógeno del AHR, la kinurenina, que a su vez favorezca la activación del AHR para regular negativamente dicha respuesta inflamatoria. La regulación negativa podría darse a través de la ubiquitinación y degradación vía proteosomal de NF- κ B inducida por el AHR [39]. Además, es posible que el ambiente inflamatorio incremente los niveles del AHR. De hecho, Champion y colaboradores observaron en células Caco-2, que el incremento en los niveles de IL-1 β resultaban en un incremento en los niveles del AHR [57].

Por lo anterior, es posible pensar en el AHR como un blanco terapéutico. Al ser activado con la administración ya sea de un agonista endógeno como la kinurenina o un agonista exógeno, es posible contrarrestar el ambiente proinflamatorio en el SNC durante el envejecimiento. Respecto a esto, se ha demostrado en modelos murinos con lesiones similares a la psoriasis y en biopsias obtenidas de humanos con psoriasis (enfermedad inflamatoria crónica de la piel), que la activación del AHR con su ligando FICZ disminuye la hiperqueratinización y la concentración de las citocinas proinflamatorias, características de esta enfermedad [58]. Aún más, los efectos del Laquinimod, medicamento que está siendo probado en humanos para evitar la progresión de la enfermedad de Huntington y la esclerosis múltiple, están mediados por el AHR [59].

Por otro lado, en el presente trabajo, se muestra que los astrocitos expresan el AHR y que este se encuentra principalmente en citosol. Es por tanto posible que el AHR citosólico desempeñe en los astrocitos otras funciones diferentes a las transcripcionales. Existen estudios que demuestran que el AHR tiene funciones en el citosol, independientemente de su actividad como factor de transcripción. Ohtake y colaboradores demostraron, en ratón, que el AHR tiene la capacidad de funcionar como una enzima ubiquitinadora E3 ligasa promoviendo la degradación vía proteosomal del receptor de andrógenos y estrógenos [60]. En otro estudio, se observó que cuando el AHR se localiza en citoplasma, tiene la capacidad de unirse a la proteína citoplasmática Caveolina-1 y junto con ella participar en la formación de las balsas lipídicas de la membrana celular [36]. Dado que la degradación de Rel/A p65 se lleva a cabo tanto en el núcleo como en el citoplasma, es posible que en los astrocitos el AHR citosólico participe en este proceso, disminuyendo el proceso inflamatorio durante el envejecimiento.

8. CONCLUSIONES

- 1) Existe un aumento en la expresión de GFAP, así como de un posible aumento en el número de células de microglia determinada por el marcador Iba1, características presentes durante el envejecimiento.
- 2) Existe diferencia significativa entre la expresión de AHR en hipocampos jóvenes comparados con hipocampos de adultos mayores de 60 años, con una tendencia al aumento en estas últimas muestras.
- 3) El AHR se expresa en células glias: astrocitos y microglia.

9. PERSPECTIVAS

- 1) Evaluar el estado de activación del AHR presente en las muestras provenientes de personas mayores de 60 años.
- 2) Determinar la expresión y diferencias del AHR en tejidos de pacientes con enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento.
- 3) Determinar si ligandos agonistas del AHR modulan negativamente la inflamación producidas por células gliares.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Rodrigue, K., K. Kennedy, and N. Raz, *Aging and longitudinal change in perceptual-motor skill acquisition in healthy adults*. J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci, 2005. **60**(4): p. P174-81.
2. Mitchell, D., A. Brown, and D. Murphy, *Dissociations between procedural and episodic memory: effects of time and aging*. Psychol Aging, 1990. **5**(2): p. 264-76.
3. Gonneaud, J., et al., *Distinct and shared cognitive functions mediate event- and time-based prospective memory impairment in normal ageing*. Memory, 2011. **19**(4): p. 360-77.
4. Gazova, I., et al., *Spatial navigation in young versus older adults*. Front Aging Neurosci, 2013. **5**: p. 94.
5. Gorbach, T., et al., *Longitudinal association between hippocampus atrophy and episodic-memory decline*. Neurobiology of Aging, 2016. **51**: p. 9.
6. Harada, C., M. Natelson, and K. Triebel, *Normal Cognitive Aging*. NIH Public Access, 2013. **29**(4): p. 737-752.
7. Fjell, A., et al., *What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus*. Prog Neurobiol, 2014. **117**: p. 20-40.
8. Katzman, R., et al., *Clinical, Pathological, and Neurochemical Changes in Dementia: A Subgroup with Preserved Mental Status and Numerous Neocortical Plaques*. Annals of neurology, 1988. **23**(2): p. 6.
9. Jurk, D., et al., *Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response*. Aging Cell, 2012. **11**(6): p. 996-1004.
10. Morozov, Y., et al., *Ultrastructural evidence for impaired mitochondrial fission in the aged rhesus monkey dorsolateral prefrontal cortex*. Neurobiol Aging, 2017. **51**: p. 9-18.
11. Dong, W., et al., *Mitochondrial dysfunction in long-term neuronal cultures mimics changes with aging*. Med Sci Monit, 2011. **17**(4): p. BR91-6.
12. Keller, J., K. Hanni, and W. Markesbery, *Impaired proteasome function in Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2000. **75**(1): p. 436-9.
13. Jiang, T. and E. Cadenas, *Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age*. Aging cell, 2014. **13**(6): p. 8.
14. Goss, J., C. Finch, and D. Morgan, *Age-related changes in glial fibrillary acidic protein mRNA in the mouse brain*. Neurobiol Aging, 1991. **12**(2): p. 165-70.
15. Campuzano, O., et al., *Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage*. J Neurosci Res, 2009. **87**(11): p. 2484-97.
16. Conde, J. and W. Streit, *Effect of aging on the microglial response to peripheral nerve injury*. Neurobiol Aging, 2006. **27**(10): p. 1451-61.
17. Damani, M., et al., *Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia*. Aging Cell, 2011. **10**(2): p. 263-76.
18. Walter, S., et al., *Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease*. Cell Physiol Biochem, 2007. **20**(6): p. 947-56.

19. Soreq, L., et al., *Major Shifts in Glial Regional Identity Are a Transcriptional Hallmark of Human Brain Aging*. Cell Rep, 2017. **18**(2): p. 557-570.
20. Hulette, C., et al., *Neurophatological and Neuropsychological Changes in "Normal" Aging: Evidence for Preclinical Alzheimer Disease in Cognitively Normal Individual*. Journal of Neurophatology and Experimental Neurology., 1998. **57**(12): p. 6.
21. Verkhatsky, A., J. Rodriguez, and V. Parpura, *Neuroglia in ageing and disease*. Cell Tissue Res, 2014. **357**(2): p. 493-503.
22. Wong, C., K. Magnusson, and E. Ho, *Aging is associated with altered dendritic cells subset distribution and impaired proinflammatory cytokine production*. Exp Gerontol, 2010. **45**(2): p. 163-9.
23. Larigot, L., et al., *AhR signaling pathways and regulatory functions*. Biochim Open, 2018. **7**: p. 1-9.
24. Vega, L. and G. Elizondo, *Aryl hydrocarbon receptor as a new therapeutic target for cancer and immune disorders*. World Journal of Pharmacology, 2013. **2**(4): p. 7.
25. Hahn, M., *Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution*. Chem Biol Interact, 2002. **141**(1-2): p. 131-60.
26. Fernandez-Salguero, P., et al., *Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor*. Science, 1995. **268**(5211): p. 722-6.
27. Waller, C. and J. McKinney, *Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of dioxins and dioxin-like compounds: model validation and Ah receptor characterization*. Chem Res Toxicol, 1995. **8**(6): p. 847-58.
28. Safe, S., *Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: progress and problems*. Environ Health Perspect, 1993. **100**: p. 259-68.
29. Poland, A. and J. Knutson, *2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-p-DIOXIN AND RELATED HALOGENATED AROMATIC HYDROCARBONS: EXAMINATION OF THE MECHANISM OF TOXICITY*. . Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. , 1982. **22**: p. 37.
30. Barron, M., R. Heintz, and S.D. Rice, *Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish*. Mar Environ Res, 2004. **58**(2-5): p. 95-100.
31. Mimura, J., et al., *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): p. 645-54.
32. Stejskalova, L., Z. Dvorak, and P. Pavek, *Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art*. Curr Drug Metab, 2011. **12**(2): p. 198-212.
33. Tian, J., et al., *The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Key Bridging Molecule of External and Internal Chemical Signals*. Environ Sci Technol, 2015. **49**(16): p. 9518-31.
34. Elizondo, G., et al., *Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast*. Mol. Pharmacol., 2000. **57**(5): p. 7.

35. Xue, P., J. Fu, and Y. Zhou, *The Aryl Hydrocarbon Receptor and Tumor Immunity*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 286.
36. Rey-Barroso, J., et al., *The Dioxin receptor modulates Caveolin-1 mobilization during directional migration: role of cholesterol*. Cell Commun Signal, 2014. **12**: p. 57.
37. Climaco-Arvizu, S., et al., *Aryl hydrocarbon receptor influences nitric oxide and arginine production and alters M1/M2 macrophage polarization*. Life Sci, 2016. **155**: p. 76-84.
38. Kimura, A., et al., *Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses*. J Exp Med, 2009. **206**(9): p. 2027-35.
39. Dominguez-Acosta, O., et al., *Activation of aryl hydrocarbon receptor regulates the LPS/IFN γ -induced inflammatory response by inducing ubiquitin-proteosomal and lysosomal degradation of RelA/p65*. Biochem Pharmacol, 2018. **155**: p. 141-149.
40. Quintana, F., et al., *Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 65-71.
41. Gutierrez-Vazquez, C. and F. Quintana, *Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor*. Immunity, 2018. **48**(1): p. 19-33.
42. Petersen, S., et al., *Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem*. J Comp Neurol, 2000. **427**(3): p. 428-39.
43. Kimura, E. and C. Tohyama, *Embryonic and Postnatal Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor mRNA in Mouse Brain*. Front Neuroanat, 2017. **11**: p. 4.
44. Latchney, S., et al., *Deletion or activation of the aryl hydrocarbon receptor alters adult hippocampal neurogenesis and contextual fear memory*. J Neurochem, 2013. **125**(3): p. 430-45.
45. Rothhammer, V., et al., *Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor*. Nat Med, 2016. **22**(6): p. 586-97.
46. Kim, S., et al., *Deletion of aryl hydrocarbon receptor AHR in mice leads to subretinal accumulation of microglia and RPE atrophy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(9): p. 6031-40.
47. Yi-Hsuan, L., et al., *Aryl hydrocarbon receptor mediates both proinflammatory and anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-activated microglia*. GLIA, 2015. **63**(7): p. 16.
48. Hu, P., et al., *Aryl hydrocarbon receptor deficiency causes dysregulated cellular matrix metabolism and age-related macular degeneration-like pathology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(43): p. E4069-78.
49. Singh, K., et al., *Loss of aryl hydrocarbon receptor promotes gene changes associated with premature hematopoietic stem cell exhaustion and development of a myeloproliferative disorder in aging mice*. Stem Cells Dev, 2014. **23**(2): p. 95-106.

50. Flaveny, C., I. Murray, and G. Perdew, *Differential gene regulation by the human and mouse aryl hydrocarbon receptor*. Toxicol Sci, 2010. **114**(2): p. 217-25.
51. Lee, Y., et al., *Aryl hydrocarbon receptor mediates both proinflammatory and anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-activated microglia*. Glia, 2015. **63**(7): p. 1138-54.
52. Frik, J., et al., *Cross-talk between monocyte invasion and astrocyte proliferation regulates scarring in brain injury*. EMBO reports, 2018. **19**(5): p. 20
53. Zunszain, P., et al., *Interleukin-1beta: a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis*. Neuropsychopharmacology, 2012. **37**(4): p. 939-49.
54. Fujigaki, S., et al., *Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism*. Eur J Immunol, 2001. **31**(8): p. 2313-8.
55. Kepplinger, B., et al., *Age-related increase of kynurenic acid in human cerebrospinal fluid - IgG and beta2-microglobulin changes*. Neurosignals, 2005. **14**(3): p. 126-35.
56. Oxenkrug, G., et al., *Peripheral Tryptophan - Kynurenine Metabolism Associated with Metabolic Syndrome is Different in Parkinson's and Alzheimer's Diseases*. Endocrinol Diabetes Metab J, 2017. **1**(4).
57. Champion, S., et al., *Activation of the NF kappa B Pathway Enhances AhR Expression in Intestinal Caco-2 Cells*. ISRN Toxicol, 2013. **2013**: p. 792452.
58. Di Meglio, P., et al., *Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions*. Immunity, 2014. **40**(6): p. 989-1001.
59. Kaye, J., et al., *Laquinimod arrests experimental autoimmune encephalomyelitis by activating the aryl hydrocarbon receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(41): p. E6145-E6152.
60. Ohtake, F., et al., *Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase*. Nature, 2007. **446**: p. 5.