



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**“Caracterización de la localización y estado de activación del AhR
en células HeLa y su asociación con la proliferación celular y
apoptosis”**

Tesis que presenta

M. en C. Alegre Angélica Flores Pérez

para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

en la especialidad de

Biología Celular

Director de Tesis:

Dr. Guillermo Elizondo Azuela

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección del Dr. Guillermo Elizondo Azuela.

Comité tutorial:

Director de tesis: Dr. Guillermo Elizondo Azuela.
Departamento de Biología Celular
CINVESTAV-IPN

Asesores:

Dr. Saúl Villa Treviño
Departamento de Biología Celular
CINVESTAV-IPN

Dr. Federico Castro Muñoz Ledo
Departamento de Biología Celular
CINVESTAV-IPN

Dr. José Efraín Garrido Guerrero
Departamento de Genética y Biología Molecular
CINVESTAV-IPN

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
IIB-UNAM

Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández
Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza
FESZ-UNAM

Durante la realización de este trabajo, la estudiante recibió la beca 38991 otorgada por el CONACyT para realizar sus estudios de doctorado. Este proyecto se llevó a cabo mediante el apoyo de CONACyT a través del proyecto No. 153377.

DEDICATORIAS

A mi hijo Rafael, a mi esposo Carlos, y a mis padres Angélica y Javier, que en conjunto me llenan de alegría.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle al Dr. Guillermo Elizondo por haberme brindado la confianza para la realización de este trabajo y por su disposición en todo momento.

A mis asesores, el Dr. Saúl Villa Treviño, el Dr. Federico Castro Muñoz Ledo, el Dr. Garrido Guerrero y la Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez, les doy las gracias por sus atinadas observaciones y disposición a escucharme.

Le doy las gracias a la Dra. Libia Vega por sus recomendaciones.

Agradezco a la Dra. María Asunción Cabañas Cortés por su enseñanza y asistencia para realizar los cultivos celulares, extracción de proteínas y RNA, síntesis de cDNA, PCR cuantitativo y citometría de flujo; y al M. en C. Jaime Escobar Herrera por su apoyo en microscopia confocal.

A mis compañeros Alejandro Mejía, Eber Gómez, Emmanuel Barbosa, Carmen Martínez, Omar Domínguez, Samantha Climaco y José Cano por su amistad y apoyo.

Al Sr. Salvador Portilla por su apoyo técnico.

Al CINVESTAV, por brindarme el espacio para desarrollarme como alumno de doctorado.

Al departamento de Biología Celular y a todos sus profesores por contribuir en mi formación académica.

Al CONACyT por contribuir a la realización de este trabajo a través del apoyo No. 153377

ÍNDICE

	Página
I ABREVIATURAS.....	7
II LISTA DE FIGURAS.....	10
III LISTA DE TABLAS.....	12
IV RESUMEN.....	13
V ABSTRACT.....	14
1 INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 Cáncer cérvico uterino.....	15
1.2 Mecanismo molecular de la carcinogénesis cervical de VPH de alto riesgo.....	15
1.3 Receptor para Hidrocarburos Aro.	18
1.3.1 Ligandos del AhR.....	19
1.3.2 Activación del AhR.....	20
1.3.3 Transporte nuclear del AhR.....	21
1.4 AhR, prolioferación celular y cáncer.....	22
2 JUSTIFICACIÓN.....	25
3 HIPÓTESIS.....	25
4 OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos particulares.....	26
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1 Material biológico.....	27
5.2 Cultivo celular.....	27
5.3 Extracción de proteínas totales de cultivos celulares.....	28
5.4 Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford....	29
5.5 Determinación de niveles proteínicos de AhR y p53 por western-blot.....	30
5.6 Extracción de RNA total.....	34
5.7 Síntesis de cDNA.....	35
5.8 PCR cuantitativo.....	35

5.9	Inmunofluorescencia.....	36
5.10	Centrifugación por gradiente de sacarosa.....	38
5.11	Sincronización de células HeLa con hidroxurea.....	41
5.12	Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	41
5.13	Inhibición de la IDO con Epacadostat.....	43
5.14	Curva de crecimiento de células HeLa.....	43
5.15	Apoptosis por anexina V y IP.....	44
5.16	Generación de células HeLa <i>AhR</i> -KO mediante CRISPR-Cas9...	45
5.17	Análisis estadístico.....	47
6	RESULTADOS.....	48
6.1	Expresión y funcionalidad del AhR en células HeLa.....	48
6.2	Caracterización de la localización sub-celular del AhR en células HeLa.....	49
6.3	La densidad celular determina los niveles de expresión del CYP1A1 en células HeLa.....	55
6.4	Inhibición de la IDO y localización sub-celular del AhR.....	57
6.5	Efecto de la α -NF y del Resv sobre la proliferación celular, niveles de p53 y apoptosis en células HeLa.....	60
6.6	Efecto de la α -NF y del Resv sobre la proliferación celular y apoptosis en células HeLa <i>AhR</i> -KO.....	69
7	DISCUSIÓN.....	73
8	CONCLUSIONES.....	82
9	PERSPECTIVAS.....	83
10	REFERENCIAS.....	84
11	APÉNDICE I.....	96
12	APÉNDICE II.....	105

I. ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
α-NF	Alfa naftoflavona
AhR	Receptor para hidrocarburos arilo
AhRR	Represor del AhR
ARNT	Proteína translocadora del AhR
AT	Azul tripano
B[a]P	Benzo[a]pireno
bHLH	Hélice-bucle-hélice básico
β-NF	Beta naftoflavona
BSA	Albúmina sérica bovina
CA-AhR	AhR constitutivamente activo
CAS	Genes asociados a CRISPR
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
CoCl₂	Cloruro de cobalto
CPCP	Cáncer de pulmón de células pequeñas
CRM1	Mantenimiento cromosómico 1, también conocido como exportina 1
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente inter-espaciadas
crRNA	RNA codificado por las CRISPR
CYP1A1	Citocromo P4501A1
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Medio <i>Eagle</i> modificado de Dulbeco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTPs	Deoxiribonucleótidos
DRE	Elemento de respuesta para dioxinas
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ET	Etopósido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

GFP	Proteína verde fluorescente
gDNA	DNA genómico
HAH	Hidrocarburos aromáticos halogenados
HeLa	Henrietta Lacks
HU	Hidroxiurea
IDO	Indolamina 2,3- dioxigenasa
I3C	Indol-3-carbinol
IP	Ioduro de propidio
KO	<i>Knockout</i> (nulo)
Kyn	Kynurenina
MEK	MAPK - proteína cinasa activada por mitógeno, ERK -cinasa regulada por señal extracelular, Kinase -cinasa
3MC	3-metilcolantreno
mm	Milímetros
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
μL	Microlitro
μM	Micromolar
NES	Señal de exporte nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
NPC	Complejo de poros nucleares
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PAS	Per -proteína del periodo circadiano, Arnt -proteína translocadora del AhR, Sim -proteína <i>single-minded</i>
pb	pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos salino
PCB	Bifenilpoliclorado
PCDD	Dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas
PCDF	Dibenzo- <i>p</i> -furanospoliclorados

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Resv	Resveratrol
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
sgRNA	Guía única de RNA
TA	Temperatura ambiente
TAD	Dominio de transactivación
TCDD	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
TDC	Tiempo de duplicación celular
TDO	Triptófano-2, 3-dioxigenasa
tracrRNA	RNA que procesa el crRNA
UV	Ultravioleta
VPH	Virus del papiloma humano
XRE	Elementos de respuesta para xenobióticos

II. LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** La ubiquitinación de p53 está mediada por UbcH7/8 y E6AP
- Figura 2** Mecanismo de acción de la proteína E7 sobre la regulación del ciclo celular
- Figura 3** Estructura proteínica del AhR
- Figura 4** Mecanismo de acción del AhR
- Figura 5** Expresión del AhR en células HeLa y HepG2
- Figura 6** La activación del AhR mediada por la β -NF incrementa los niveles de mRNA del CYP1A1 en células HeLa
- Figura 7** La densidad celular determina la localización sub-celular del AhR en células HeLa
- Figura 8** Sincronización de cultivos dispersos de células HeLa
- Figura 9** Localización celular del AhR en células HeLa en diferentes fases del ciclo celular
- Figura 10** Expresión basal e inducción del mRNA del CYP1A1 en cultivos confluentes y dispersos de células HeLa
- Figura 11** Expresión basal del mRNA del CYP1A1 en células HeLa cultivadas a diferentes densidades
- Figura 12** Efecto del Epacadostat sobre la localización sub-celular del AhR en células HeLa
- Figura 13** La α -NF y el Resv disminuyen los niveles basales e inducidos de mRNA del CYP1A1
- Figura 14** La α -NF y el Resv disminuyen la proliferación celular de células HeLa
- Figura 15** IC₅₀ de la α -NF y del Resv
- Figura 16** La α -NF incrementa los niveles de apoptosis en células HeLa
- Figura 17** El Resv incrementa los niveles de apoptosis en células HeLa

- Figura 18** La α -NF y el Resv aumentan los niveles de p53 en células HeLa
- Figura 19** Análisis del genotipo y fenotipo de células HeLa transfectadas con gRNAs y pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)
- Figura 20** Efecto de la α -NF y el Resv sobre la proliferación celular y apoptosis en células HeLa *AhR*-WT, Mock y *AhR*-KO.

III. LISTA DE TABLAS

- | | |
|----------------|--|
| Tabla 1 | Efecto de la α -NF sobre el tiempo de duplicación celular (TDC) en células HeLa |
| Tabla 2 | Efecto del Resv sobre el tiempo de duplicación celular (TDC) en células HeLa |

IV. RESUMEN

El receptor para hidrocarburos arilo (AhR), es un factor de transcripción dependiente de ligando que está involucrado en procesos críticos para la homeostasis celular, como la proliferación celular y apoptosis. Se sabe que la desregulación de estos procesos contribuye a la formación de tumores y al desarrollo del cáncer. En particular, se ha observado en diversos carcinomas humanos la sobre-expresión y activación del AhR. Sin embargo, la información referente a los mecanismos a través de los cuales se da dicha inducción, así como sus efectos en las células transformadas, es escasa. En el presente trabajo se caracterizó, en células HeLa, el estado de activación del AhR, y se evaluó si su bloqueo resulta en una pérdida de las características de las células transformadas. Los resultados muestran que la localización sub-celular del AhR es predominantemente nuclear en cultivos dispersos, al tiempo que la expresión del mRNA del CYP1A1 (gen canónico del AhR), es mayor con respecto a la condición de cultivo confluyente. Por otro lado, el tratamiento con ligandos antagonistas del AhR, α -NF y Resv, resultó en un incremento de los niveles de p53 y apoptosis, así como en una disminución de la proliferación celular. A través del uso de CRISPR-Cas9, se obtuvieron células HeLa AhR-KO, con las cuales se determinó que los efectos de la α -NF y Resv sobre la apoptosis y proliferación celular son independientes del AhR. Adicionalmente, se evaluó la proliferación celular y apoptosis de células HeLa AhR-WT y AhR-KO, en ausencia de ligando exógeno, sin encontrarse diferencias significativas. Los resultados obtenidos sugieren que la localización sub-celular del AhR está determinada por la confluencia, y que dicho factor de transcripción no incide en la proliferación celular de las células HeLa.

V. ABSTRACT

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-dependent transcription factor that is involved in processes critical for cell homeostasis, such as cell proliferation and apoptosis. Deregulation of these processes contributes to tumor formation and cancer development. In particular, the over-expression and activation of AhR has been observed in various human carcinomas. However, information concerning the mechanisms through which such induction is given, as well as its effects on transformed cells, is scarce. In the present work, the activation status of the AhR in HeLa cells was characterized. It was also evaluated whether AhR blocking results in a loss of the characteristics of the transformed cells. Results indicated that the sub-cellular localization of AhR is predominantly nuclear in disperse cell cultures, while the expression of mRNA of CYP1A1 (canonical gene of AhR) is higher compared to confluent cultures, suggesting that the AhR is transcriptionally active in disperse cultures. On the other hand, treatment with AhR antagonists, α -NF and Resv, resulted in an increase in p53 levels and apoptosis rate, as well as a decrease in cell proliferation. Through the use of HeLa *AhR*-KO cells, generated with CRISPR-Cas9 technology, it was determined that the effects of α -NF and Resv on apoptosis and cell proliferation are AhR-independent. Additionally, cell proliferation and apoptosis of HeLa *AhR*-WT and *AhR*-KO cells were evaluated in the absence of exogenous ligand, without finding significant differences between them. The present results demonstrated that the sub-cellular localization of AhR is determined by the confluence, and that this transcription factor does not affect cell proliferation of HeLa cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer cérvico uterino

La infección viral más común del tracto reproductivo está asociada al virus del papiloma humano (VPH), el cual se transmite esencialmente a través del contacto sexual. La mayoría de las mujeres y hombres sexualmente activos estarán infectados por VPH en algún punto de sus vidas. Usualmente, la infección desaparecerá en la mayoría de los casos, sin embargo, una pequeña proporción de infecciones con VPH de alto riesgo (e.g. VPH 16 y 18) pueden persistir y progresar a cáncer, principalmente en cáncer cérvico uterino (CCU).

Aunque los datos sobre cánceres ano-genitales son limitados, existe evidencia creciente que vincula al VPH con cánceres de ano, vulva, vagina, pene, cabeza y cuello. A pesar de que estos cánceres son menos frecuentes que el cérvico uterino, su asociación con el VPH los hace potencialmente prevenibles usando estrategias de prevención similares a aquellas usadas para el CCU.

El CCU es la segunda causa de muerte más común en mujeres en países en vías de desarrollo, con 445 000 nuevos casos estimados en 2012. En este mismo año, aproximadamente 270 000 mujeres murieron de cáncer cervical (más del 85% de estas muertes ocurrieron en países de bajos a medianos ingresos) [1, 2].

1.2. Mecanismo molecular de la carcinogénesis cervical de VPH de alto riesgo

El genoma del VPH en una célula infectada se encuentra como un plásmido extra-cromosomal (episoma), pero en lesiones malignas el DNA está integrado en el genoma del huésped. La integración generalmente irrumpe la integridad del gen E2 lo que resulta en la pérdida de su expresión. Lo anterior provoca la sobre-expresión de los genes E6 y E7, dado que E2 los modula negativamente [3].

E6 y E7 son oncoproteínas relacionadas con la carcinogénesis cervical. La proteína E6 de los VPH de alto riesgo se une directamente a E6AP (E6 associated protein), una ligasa de ubiquitina codificada por el gen *UBE3A*, lo que provoca que su especificidad se vea alterada. Es entonces cuando E6-E6AP y UbcH7, una enzima de conjugación de ubiquitina, se asocian establemente con p53, lo poliubiquitan y promueven su degradación proteosomal [4, 5] (Figura 1). Es decir, E6 actúa como una oncoproteína estimulando la destrucción de p53, quizás el principal supresor de tumores en cáncer humano.

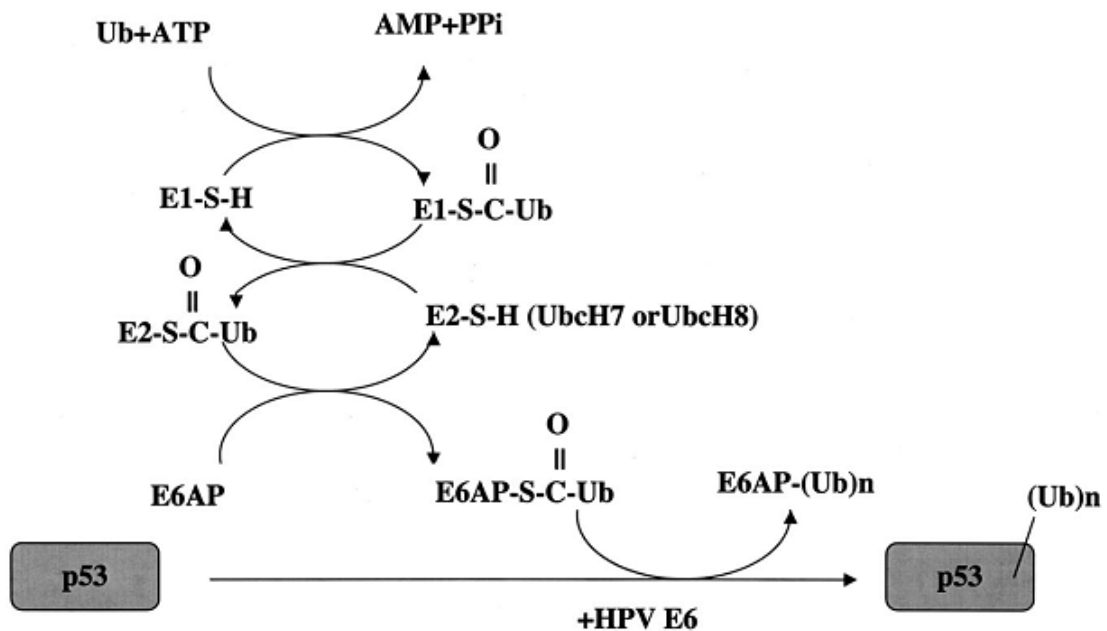


Figura 1. La ubiquitinación de p53 está mediada por UbcH7/8 y E6AP [6].

Por otro lado, la proteína E7 de los VPH de alto riesgo tiene la capacidad de unirse a la forma activa hipofosforilada de retinoblastoma (pRb, otro supresor de tumores) provocando su degradación [7]. El estado de fosforilación de retinoblastoma está regulado a través del ciclo celular, siendo hipofosforilado en G₀/G₁ y fosforilado (ppRb) en S y G₂/M. Como pRb regula negativamente el ciclo celular en la frontera de G₁-S, al ser inactivado por E7, permite la progresión del ciclo celular [6].

La forma activa de Rb, es decir, pRb, se encuentra asociada a E2F, un factor de transcripción que está involucrado en la transcripción de genes necesarios para la replicación del DNA. Cuando E7 se une a pRB, la liberación de E2F se lleva a cabo facilitando su actividad transcripcional y la entrada a la fase S del ciclo celular [8] (Figura 2).

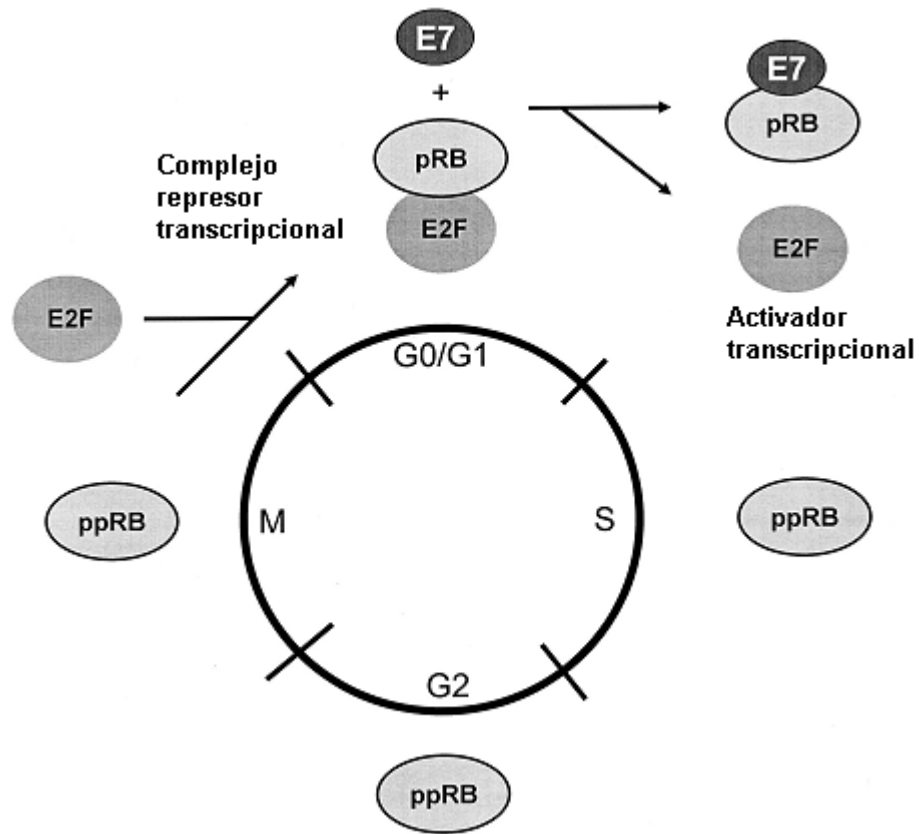


Figura 2. Mecanismo de acción de la proteína E7 sobre la regulación del ciclo celular [6].

1.3. Receptor para Hidrocarburos Arolicios

El receptor para hidrocarburos arolicios (AhR) es un factor de transcripción dependiente de ligando que regula la expresión de diversos genes [9]. Pertenece a la súper familia bHLH-PAS (*basic-helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim*) dentro de la que se encuentran, además del AhR, el AhRR (represor del AhR) y el translocador nuclear del AhR (ARNT, por sus siglas en inglés) [10].

En mamíferos, el AhR se expresa de manera constitutiva en diversos tejidos, encontrándose las concentraciones más altas de mRNA en hígado, riñón, pulmón, corazón, timo, útero y placenta [11-14].

El AhR humano está formado por 848 aminoácidos. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio bHLH, necesario para la unión a DNA y la dimerización de la proteína con ARNT. El dominio PAS está localizado junto al extremo C-terminal del dominio bHLH y comprende 250-300 aminoácidos. Contiene dos subdominios de aproximadamente 50 aminoácidos, PAS-A y PAS-B. El dominio PAS sirve como sitio de anclaje para otras proteínas PAS y para la proteína chaperona HSP90. El dominio PAS-B posee un sitio de unión a ligando que parcialmente se sobrelapa con el sitio de unión a HSP90 (Figura 3). En la región C-terminal del AhR se encuentra un dominio de transactivación (TAD) rico en glutamina, el cual interactúa con diversos co-activadores transcripcionales, por lo tanto es indispensable para que el AhR lleve a cabo la activación de sus genes blanco [15, 16].

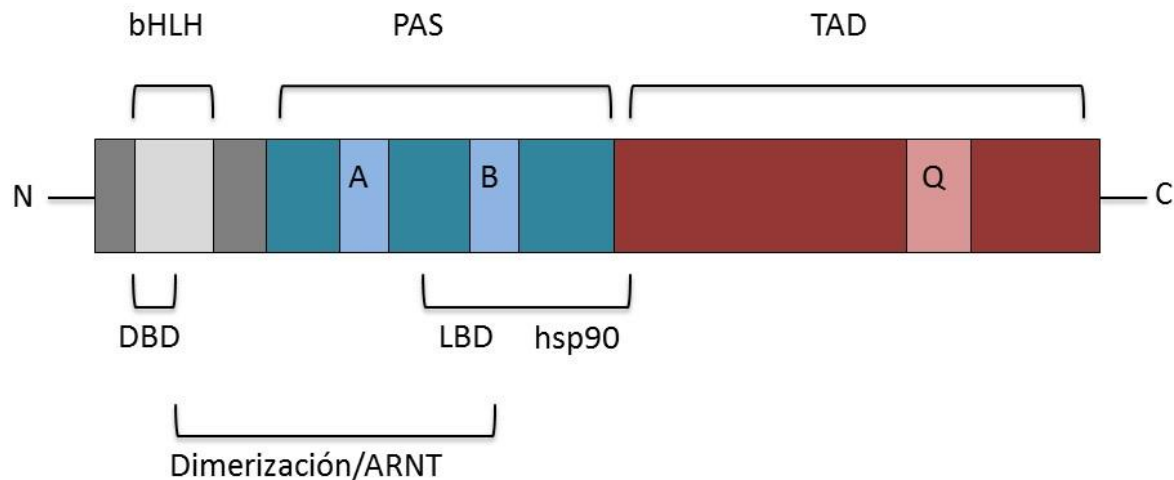


Figura 3. Estructura proteínica del AhR [17]

1.3.1 Ligandos del AhR

Estructuralmente, los ligandos del AhR son moléculas planas, con dimensiones máximas de 14 x 12 x 5 Å, hidrofóbicas que se unen en el orden de nM a μM [18]. Los ligandos del AhR se han separado en dos categorías principales, los de naturaleza sintética, es decir, de origen antropogénico como contaminantes ambientales y diversos fármacos, y los conocidos como ligandos naturales, aquellos sintetizados por diversos sistemas biológicos como microbios, plantas y animales incluyendo al humano. La mayoría de los ligandos agonistas con alta afinidad por el AhR son miembros de la primera categoría e incluyen hidrocarburos aromáticos halógenados (HAHs) como los bifenilos policlorados (PCB), dibenzo-*p*-furanos policlorados (PCDF) y dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDD); y por hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) como el 3-metilcolantreno (3MC), benzo[*a*]pireno (B[*a*]P), benzoantracenos y benzoflavonas [15]. También se han identificado ligandos antagonistas como la alfa naftoflavona (α-NF), un compuesto químico perteneciente al grupo de los PAHs que bloquea la inducción de la expresión del gen *CYP1A1* (gen canónico del AhR) mediada por el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) [19, 20], ligando agonista de este factor de transcripción.

Se han identificado ligandos naturales del AhR cuya estructura y propiedades fisicoquímicas son muy diferentes a los ligandos pertenecientes al grupo de los PAHs y los HAHs. Los primeros reportes de ligandos naturales vienen de observar que componentes de vegetales y algunos derivados del triptófano pueden inducir la expresión del CYP1A1 [21, 22]. Ha sido reportada la habilidad de compuestos como la kinurenina (metabolito derivado del triptófano) [23, 24], el FICZ (fotoproducto derivado del triptófano) [25], el indol-3-carbinol (I3C) [26] y la curcumina [27] (derivados vegetales), de inducir la expresión de genes dependientes de este receptor.

Por otro lado, el Resveratrol (Resv) que es un producto natural polifenólico presente en la piel de las uvas y ciruelas, vino tinto y cacahuates [28], actúa como un antagonista del AhR previniendo la unión del heterodímero AhR-ARNT al DNA inducida por TCDD y B[a]P, inhibiendo la transcripción del CYP1A1 [29, 30]. Casper y colaboradores demostraron, en células HepG2 y T47D, que el Resv desplaza al TCDD [1,6-³H] del AhR, además de promover la translocación del AhR hacia el núcleo sin que se lleve a cabo la transactivación de sus genes blanco [31].

1.3.2 Activación del AhR

En ausencia de ligando, el AhR se encuentra en el citoplasma formando un complejo con las proteínas HSP90, XAP2 y p23 (proteínas chaperonas). Una vez unido a su ligando, el receptor Ah es activado mediante un cambio conformacional que expone su señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés). Lo anterior resulta en la translocación del complejo ligando-receptor al núcleo donde forma un heterodímero con ARNT. El complejo formado por el ligando-receptor-ARNT interactúa con regiones específicas del DNA denominadas elementos de respuesta para xenobióticos o dioxinas (XRE o DRE, por sus siglas en inglés) localizados en las regiones promotoras de sus genes blanco, regulando la expresión, de manera positiva o negativa, de una batería de genes involucrados en procesos de biotransformación, homeostasis del sistema

inmune, regulación del ciclo celular, proliferación celular y apoptosis, entre otros [32-36] (Figura 4).

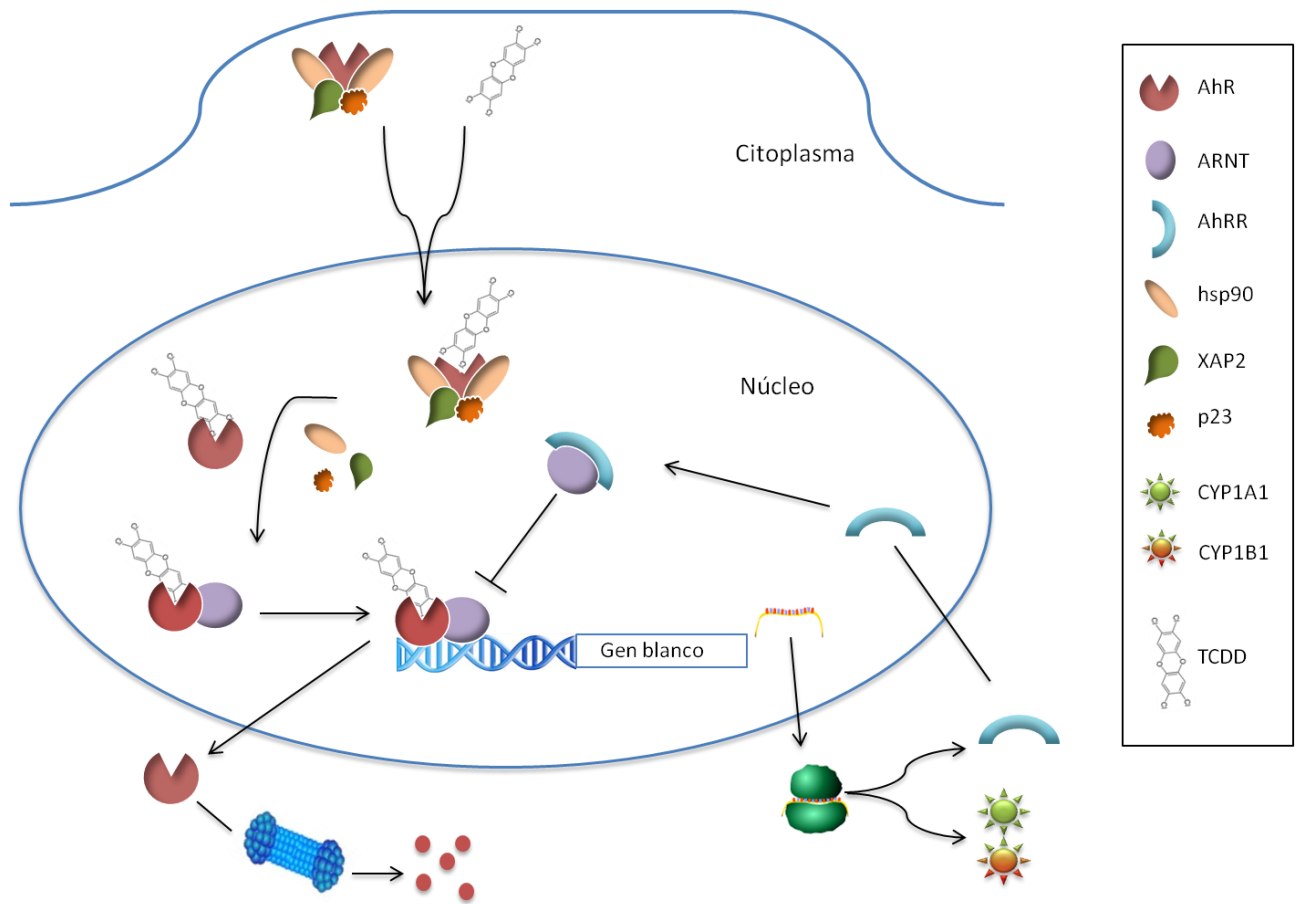


Figura 4. Mecanismo de acción del AhR [17].

1.3.3 Transporte nuclear del AhR

La entrada y salida de moléculas en el núcleo se da a través del complejo de poros nucleares (NPC, por sus siglas en inglés), presentes en la membrana nuclear [37]. Los NPCs permiten la difusión pasiva de moléculas menores a 40 kDa. El paso de moléculas de pesos mayores es favorecido por proteínas transportadoras como importinas y exportinas (también llamadas carioferinas), las cuales son capaces de reconocer NLS y señales de exporte nuclear (NES, por sus siglas en inglés). Tanto la

NLS como la NES, son secuencias de aminoácidos presentes en proteínas destinadas al paso a través de los NPCs [38].

En el citoplasma, la NLS es reconocida por la importina α , posteriormente este complejo es reconocido por la importina β , la cual facilita el paso del complejo ternario a través del NPC. Sin embargo, la importina β es capaz de unirse directamente a la NLS y mediar el importe nuclear. En el núcleo, la NES es reconocida por la exportina 1 (también conocida como CRM1), proteína que media el exporte hacia el citoplasma [38, 39].

La translocación del AhR entre el citoplasma y el núcleo ha sido poco estudiado, no obstante, se ha reportado la interacción de la importina β con el AhR en extractos citoplásmicos [40]. Adicionalmente, se han identificado NLS y NES en este factor de transcripción [41, 42] necesarias para su paso entre el citoplasma y el núcleo.

En diversas líneas celulares derivadas de CCU, así como en biopsias provenientes del mismo cáncer, se ha reportado la sobre-expresión de la importina β y de CRM1, con respecto a sus controles, lo que las convierte en un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de esta patología [43].

1.4 AhR, proliferación celular y cáncer

En años recientes, el AhR ha sido asociado con la regulación de varios procesos celulares diferentes a la biotransformación, como proliferación celular y apoptosis. Inicialmente, la idea de que este factor de transcripción podría regular tanto la proliferación celular como el proceso de apoptosis surgió de los efectos del TCDD, ligando de este receptor, sobre estos procesos celulares. Se ha observado, en un modelo de hepato-carcinogénesis en ratas, que el TCDD incrementa la proliferación de los hepatocitos al tiempo que inhibe la apoptosis [44]. Por otro lado, varios estudios *in vitro* han demostrado que el TCDD inhibe el proceso de apoptosis inducido por

diferentes agentes como la luz UV, acetil aminoflourano y etopósido, entre otros [45, 46]. El vínculo directo con el AhR se estableció mediante el uso de un ratón deficiente en la expresión del AhR (*AhR-KO*). Zaher y colaboradores observaron que los hepatocitos provenientes del ratón *AhR-KO* presentaban un incremento en el número de células apoptóticas [47]. Posteriormente, en fibroblastos embrionicos de ratón derivados de este mismo modelo, se observó que las células *AhR-KO* proliferaban hasta tres veces menos comparadas con las células silvestres, presentando un incremento en los niveles de apoptosis y un arresto en la fase G₂-M del ciclo celular [32].

Se sabe que la desregulación de la proliferación celular y de la apoptosis contribuyen a la formación de tumores y al desarrollo del cáncer. Particularmente, se ha demostrado que el AhR está sobre-expresado en varios tipos de cáncer como el carcinoma de pulmón, hepatocarcinoma y cáncer pancreático [48-50]. En cambio, la sobre-expresión de un AhR no funcional en células HeLa (derivadas de CCU) favorece el desarrollo de tumores de menor tamaño en ratones atímicos con respecto a su control. Por otro lado, se ha reportado que la vía de señalización del AhR se encuentra desregulada en muestras provenientes de CCU [51], así como en un modelo murino de cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) inducido por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH [52]. Otros estudios demuestran que macacos tratados con TCDD, ligando agonista del AhR, desarrollan metaplasias escamosas en el cérvix [53], además de presentar una disminución de los niveles de p53 en las células en dicho tejido [54]. Recientemente, nuestro laboratorio reportó que el AhR modula los niveles de p53 a través de la regulación de su degradación proteínica [36]. En este estudio, se determinó que el AhR modula de manera positiva la expresión genética de *UbcH7*, un gen que codifica para una enzima de conjugación de ubiquitinas, favoreciendo la degradación de p53 vía ubiquitina-proteosoma. Este mecanismo, a través del cual se inactiva a p53, es similar al utilizado por el VPH, cuya infección puede resultar en el desarrollo del CCU.

Por otro lado, se ha reportado que el AhR se encuentra en el núcleo en líneas celulares derivadas de cáncer cerebral en ausencia de ligando exógeno [55]. A este respecto, se ha observado en cultivos no confluentes de células HaCat en ausencia de ligando

exógeno, que la localización sub-celular del AhR es predominantemente nuclear al tiempo que es transcripcionalmente activo; mientras que en células confluentes, es predominantemente citoplásmico y su actividad transcripcional disminuye [56]. Estos resultados sugieren la presencia de un posible ligando endógeno durante la transformación celular.

Desde que se reportó la activación del AhR e inducción del CYP1A1 por la kynurenina y por el FICZ [23-25], se ha especulado que los metabolitos derivados del triptófano podrían ser los ligandos endógenos responsables de la activación del AhR. La kinurenina se forma a partir del metabolismo del triptófano por la vía de la kinurenina, donde participan las enzimas indolamina 2,3- dioxigenasa (IDO) y la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO). Estas enzimas catalizan la primer reacción de biotransformación del triptófano para generar *N*-formilkinurenina que dará lugar a la kinurenina [57, 58]. Recientemente se ha asociado la expresión de la TDO con la expresión del CYP1B1 (gen blanco del AhR) en diversos tipos de cáncer como el cáncer cerebral, de pulmón, de ovario y cérvico uterino [55]. Por otra parte, la sobre-expresión de la IDO ha sido detectada en tumores de ciertos tipos de cáncer como glioblastomas, de páncreas, de próstata y cervical [59]. Con respecto a este último, los niveles de mRNA de la IDO así como los niveles de kinurenina son elevados en comparación con el tejido sano [60].

Los estudios anteriores sugieren que la presencia y activación del AhR favorece procesos transformadores, y que su inhibición a través del uso de antagonistas podría disminuir la proliferación de células derivadas de CCU.

2. JUSTIFICACIÓN

Existe información que vincula al AhR con el desarrollo de diversos carcinomas como el CCU. Sin embargo, la información disponible referente a los mecanismos a través de los cuales se da dicha asociación es escasa. Por lo anterior, es importante caracterizar el estado de activación del AhR, así como determinar si ligandos de este receptor modifican las características de células derivadas de CCU.

3. HIPÓTESIS

El AhR se encuentra en su estado activo en células HeLa y su inactivación resultará en un incremento en los niveles de apoptosis y una disminución en la proliferación celular.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar la localización sub-celular del AhR y los niveles de expresión de su gen canónico; así como evaluar si antagonistas del AhR promueven la apoptosis e inhibición de la proliferación en células HeLa.

4.2 Objetivos particulares

Etapa I. Evaluación de la funcionalidad del AhR en células HeLa

- Evaluar la presencia del AhR y su funcionalidad en células HeLa.
- Determinar y caracterizar la localización sub-celular del AhR en células HeLa.
- Determinar si la localización sub-celular del AhR está asociada a la IDO.
- Evaluar si la localización sub-celular del AhR, en células HeLa, determina los niveles de expresión del CYP1A1.

Etapa II. Efecto de la inhibición del AhR sobre la apoptosis y proliferación celular

- Determinar si ligandos antagonistas del AhR modifican la proliferación celular en células HeLa.
- Evaluar si ligandos antagonistas del AhR modifican los niveles de p53 y apoptosis en células HeLa.
- Generar células HeLa *AhR*-KO mediante el sistema CRISPR/CAS9
- Determinar si los efectos de los antagonistas del AhR sobre la proliferación celular y apoptosis son dependientes de este receptor.
- Investigar el efecto de la eliminación del AhR sobre la proliferación celular y apoptosis en células HeLa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Se utilizó la línea celular HepG2 (ATCC HB-8065), derivada de un hepatocarcinoma humano, y la línea celular HeLa (amablemente proporcionada por el Dr. Juan Pedro Luna Arias, CINVESTAV-IPN México), derivada de un carcinoma cervical de humano y que se caracteriza por tener insertado el DNA del VPH-18 en el genoma celular [61].

5.2 Cultivo celular

Las líneas celulares HepG2 y HeLa se cultivaron en medio completo DMEM-alta glucosa (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (HyClone, Logan, UT, USA) y 1% de antibióticos/antimicóticos (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las células se mantuvieron en cultivo a 37 °C, en una incubadora con 5% de CO₂ y en una atmósfera húmeda en placas para cultivo de 100 mm de diámetro (Corning Incorporated, NY). A las células se les cambió el medio cada 2-3 días.

Para despegar las células de la placa de cultivo, se les extrajo el medio sobrenadante, se agregaron 2 mL de una solución atemperada de tripsina-EDTA (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) y se incubaron durante 5 min a 37 °C. Se colectó la suspensión celular y se obtuvo la pastilla celular por centrifugación a 1,500 rpm durante 5 min a 21 °C. El sobrenadante se descartó y la pastilla celular se resuspendió en medio suplementado para su resiembra o en medio de congelación (DMEM, 10% de DMSO, 10% de suero fetal de bovino) para su almacenamiento.

Para realizar los cultivos dispersos y confluentes se sembraron 4.0×10^3 y 3.3×10^4 células HeLa/cm², en medio DMEM completo. Al cabo de 2 días, se consideraron cultivos dispersos y confluentes, respectivamente. Para obtener cultivos con densidades celulares intermedias a las mencionadas anteriormente, se sembraron 8.1×10^3 y 1.6×10^4 células HeLa/cm².

5.3 Extracción de proteínas totales de cultivos celulares

Principio:

Para obtener proteínas totales, las células tienen que ser lisadas empleando soluciones de lisis que mantengan un pH constante y con detergentes que rompan las barreras lipídicas que rodean a las proteínas para que incrementen su solubilidad [62, 63].

Procedimiento:

La extracción de proteínas totales de los cultivos celulares se realizó siguiendo el procedimiento reportado por Froyen y Steinberg [64], el cual se describe a continuación:

Se retiró el medio de cultivo del pozo con una pipeta pasteur y se adicionaron 0.5 mL de buffer de extracción, recuperando con movimientos suaves el contenido celular de cada pozo. A continuación, este se transfirió a un tubo de microfuga y se agitó en vórtex. Las muestras se colocaron en hielo por 1 h realizando agitación en vórtex cada 10 min. Transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron 10 min a 12,000 rpm a 4 °C, se recuperó el sobrenadante en un tubo de microfuga nuevo y las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Reactivos y soluciones

-	Buffer de extracción	
	HEPES	95.3 mg
	EDTA	7.4 mg
	Glicerol	2.0 mL
	Tritón X-100	0.2 mL
	Inhibidor de proteasas (Roche, Zwitterland)	2.0 tabletas
	Aforo (agua Milli Q)	20.0 mL
	pH	7.5

5.4 Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.

Principio:

El ensayo se basa en la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250, principalmente a los residuos de aminoácidos aromáticos, y particularmente a la arginina. Dicha unión genera un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm y es el incremento en la absorción a 595 nm lo que se monitorea [65].

Procedimiento:

El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos.

- a) Curva estándar de BSA. Se preparó una solución stock de BSA (1 mg/mL). Se colocaron en el primer pozo 10 μ L de BSA (10 μ g) y 310 μ L de agua destilada, para completar un volumen final de 320 μ L. En los siguientes 5 pozos (segundo al sexto) se colocaron 160 μ L de agua destilada y a partir del primer pozo, se realizaron diluciones seriadas dobles de la siguiente manera: se tomaron 160 μ L del primer pozo y se mezclaron con los 160 μ L de agua destilada del segundo pozo y así sucesivamente hasta el sexto pozo, obteniendo 5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 y 0.156 μ g de BSA, respectivamente. El séptimo pozo contiene únicamente 160 μ L de agua destilada (se usa como blanco). Se adicionaron 40 μ L de reactivo de Bradford 5X (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a cada pozo y se mezclaron perfectamente.
- b) Preparación de las muestras. En un volumen de 160 μ L, se preparó una dilución 1:160 de cada muestra y se colocó el volumen en la placa de 96 pozos; a continuación se adicionaron, a cada pozo, 40 μ L de reactivo de Bradford 5X y se mezclaron.
- c) Lectura de las muestras. La placa de 96 pozos que contiene la curva estándar de BSA y las muestras se leyeron en un lector de ELISA Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) a una longitud de onda de 595 nm.

Reactivos y soluciones

- Solución stock BSA (1mg/mL)

BSA	1 mg
Agua destilada	1 mL

5.5 Determinación de niveles proteínicos de AhR y p53 por western blot

Principio:

El objetivo de esta técnica es separar proteínas de acuerdo a su peso molecular y carga. Las proteínas se separan por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Posteriormente, son transferidas a una membrana de nitrocelulosa donde se pueden identificar a través del uso de anticuerpos específicos contra la proteína de interés [66].

Procedimiento:

- a) Preparación de la muestra. De cada muestra se tomaron 40 µg de proteína para ser desnaturizada con solución amortiguadora para muestras 5X, la cual contiene β-mercaptoetanol como agente reductor. Las muestras se incubaron en baño de agua en ebullición por 5 min.
- b) Separación electroforética. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 12% utilizando buffer de electroforesis 1X. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente (TA) y a voltaje constante de 100 V por 3 h.
- c) Electrotransferencia. Posterior a la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando buffer para transferencia semi seca. La transferencia se realizó a 20 V durante 1 h en un equipo Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-RadHercules, CA, USA). Finalizada la transferencia, la membrana se tiñó con Rojo de Ponceau por aproximadamente 2 min para evaluar la eficiencia de la misma. Posteriormente, la membrana se lavó con solución PBS 1X para eliminar el exceso de colorante y se bloqueó durante 12 h a 4 °C para p53 o durante 1 h a TA para AhR con solución bloqueadora.

- d) Inmunodetección. Se realizaron lavados de la membrana con solución de lavado TBS (15, 10 y 5 min cada uno a TA y con agitación) y un lavado de 5 min con solución TBS-Tween 0.1%. A continuación, la membrana se expuso al primer anticuerpo, anti-p53 (DO-1, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) o anti-AhR (RPT1, Abcam, Cambridge, MA, USA) a una dilución de 1:1000 por 3 o 12 h a 4 °C, respectivamente, con agitación constante. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces bajo el mismo esquema mencionado y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa, a una dilución 1:5000 por 2 h a 4 °C para p53 o 1:6000 por 2 h a TA para AhR con agitación constante. Finalizado el tiempo, la membrana se lavó nuevamente siguiendo el mismo esquema. La membrana fue expuesta a una mezcla de volúmenes iguales de la solución de luminol y de la solución de peróxido del kit Immobilon® (Millipore, Billerica, MA, USA). La señal producida por la oxidación del luminol finalmente fue captada en una placa auto-radiográfica. La inmunodetección de la proteína de actina se realizó bajo las mismas condiciones que se usaron para el AhR, utilizando los anticuerpos específicos para dicha proteína a una dilución 1:2000 para el anticuerpo anti-actina (I-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) y 1:2000 para el anticuerpo secundario (anti-cabra).

Reactivos y soluciones

-	PBS 1X	
	NaCl	16.0 g
	KCl	0.4 g
	Na ₂ HPO ₄	2.3 g
	KH ₂ PO ₄	0.4 g
	Aforo (agua Milli Q)	2.0 L
	pH	7.4

-	Solución amortiguadora de muestra 5X	
	Tris 1M pH 6.8	0.6 mL
	Glicerol 50%	5.0 mL
	SDS 10%	2.0 mL
	Azul de Bromofenol 1% (p/v)	1.0 mL
	β -mercaptoetanol 0.288 M	0.5 mL
	Aforo (agua Milli Q)	10.0 mL
-	Solución de acrilamida 30%	
	Acrilamida	29.2 g
	Bis-acrilamida	0.8 g
	Aforo (agua Milli Q)	100.0 mL
	pH	7.0
-	Solución del gel separador 12%	
	Acrilamida 30%	4.0 mL
	Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 mL
	Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%	0.1 mL
	Persulfato de amonio (APS) 10%	0.1 mL
	TEMED	4.0 μ L
	Aforo (agua Milli Q)	10.0 mL
-	Solución del gel concentrador 4%	
	Acrilamida 30%	0.67 mL
	Tris 1.0 M pH 6.8	0.50 mL
	SDS 10%	0.04 mL
	APS 10%	0.04 mL
	TEMED	4.00 μ L
	Aforo (agua Milli Q)	4.00 mL

-	Solución de electroforesis 5X	
	Tris	15.14 g
	Glicina	93.84 g
	SDS	5.00 g
	Aforo (agua MilliQ)	1.00 L
	pH	8.3
-	Solución de transferencia	
	Tris	5.82 g
	Glicina	2.93 g
	Metanol	200.00 mL
	Aforo (agua Milli Q)	1.00 L
-	Solución bloqueadora	
	Leche descremada	0.40 g
	BSA	0.10 g
	Aforo (solución TBS pH 8.0)	20.00 mL
-	Solución TBS	
	Tris	2.4 g
	NaCl	8.0 g
	Aforo (agua Milli Q)	1.0 L
	pH	8.0
-	Solución TBS-Tween 0.1%	
	Tween	1.0 mL
	Aforo (solución TBS pH 8.0)	1.0 L

5.6 Extracción de RNA total

Principio

La extracción de RNA total se realizó mediante el método de TRizol®. El reactivo TRizol® es una solución monofásica de fenol-isotiocianato de guanidina, la cual, durante la fase de lisado celular mantiene la integridad del RNA mientras que disuelve los demás componentes celulares al realizar una centrifugación. De la centrifugación se obtienen dos fases: orgánica y acuosa, y en ésta última se localiza el RNA, que posteriormente es precipitado por la adición de alcohol isopropílico [67].

Procedimiento

- a) Homogenización: En esta etapa se adicionó 1.0 mL de TRizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por cada 1×10^6 células, se resuspendió y se transfirió a un tubo de microfuga de 1.5 mL.
- b) Fase de separación: Las muestras se incubaron por 5 min a TA para permitir la completa disociación. A continuación, se adicionaron 200 μ L de cloroformo por cada mL de TRizol® utilizado a cada muestra y se agitaron vigorosamente por 15 s; transcurrido el tiempo, se incubaron por 2 min a TA y se realizó una centrifugación a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C.
- c) Fase de precipitación: De la centrifugación anterior, se transfirió la fase acuosa a un tubo de microfuga nuevo y se adicionaron 500 μ L de isopropanol por cada mL de TRizol®. Cada muestra se mezcló por inversión y se incubaron 10 min a TA. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C.
- d) Fase de lavado: De la centrifugación anterior, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1.0 mL de etanol al 75% por cada mL de TRizol® y se realizó una centrifugación a 7,500 rpm por 5 min a 4 °C. El RNA se disolvió en 20 μ L de agua DEPC.

Finalmente, con 1.0 μ L de muestra se verificó la integridad del RNA mediante un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% por 1 h a un voltaje constante de

100 V. La cuantificación del RNA se realizó mediante espectrofotometría a 260 nm en un equipo Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA).

5.7 Síntesis de cDNA.

Principio

El DNA complementario (cDNA) es una copia de DNA sintetizado a partir de un molde de RNA. La síntesis de cDNA consiste en la formación de un híbrido de cDNA-RNA formado por la acción de la enzima transcriptasa reversa [68, 69].

Procedimiento

En un tubo de PCR se adicionaron 1.0 μ L de cebadores azarosos (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, [250 ng/ μ l]), 3.0 μ g de RNA (volumen necesario) y agua DEPC para ajustar a un volumen final de 14.0 μ L. Las muestras se colocaron en un termociclador y se desnaturalizaron 5 min a 65 °C. Finalizado el tiempo, se colocaron en hielo por 2 min. Posteriormente, se adicionaron a cada muestra 6 μ L de una mezcla de reacción que contiene 4.0 μ L de buffer 5X, 1.0 μ l DTT, 1.0 μ L dNTPs 10 mM y 0.5 μ L de enzima Super Script First-Strand Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las muestras se incubaron en un termociclador por 40 min a 50 °C y al término, se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.8 PCR cuantitativo

Principio

Para la amplificación del cDNA se utiliza una sonda reportera que emite fluorescencia cada vez que se sintetiza una cadena nueva (cadena hija) a partir de la cadena molde. La técnica de PCR-Tiempo Real o PCR cuantitativo mide la degradación de la sonda marcada con dos fluorocromos (sonda reportera y “quencher”) por la actividad de la enzima *Taq polimerasa* en cada ciclo de amplificación, siendo la cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado [70].

Procedimiento

Para evaluar la amplificación de los cDNA, se utilizó un termociclador acoplado a un espectrofotómetro StepOne Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, Branchburg, NJ, USA). Los niveles de amplificación fueron analizados usando el umbral de expresión correspondiente (Ct). Se amplificaron los cDNA correspondientes a los genes *CYP1A1* y *GAPDH* (con número de identificación Hs02382618_s1 y 4326317E, respectivamente, obtenidos de AppliedBiosystems, Branchburg, NJ, USA), éste último utilizado como valor para normalizar la expresión.

Reactivos y soluciones

- Mezcla de reacción de amplificación	
cDNA	1.0 µL
TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	7.5 µL
H ₂ O Milli Q	0.1 µL
Sonda	0.4 µL

5.9 Inmunofluorescencia

Principio

La inmunofluorescencia aprovecha la capacidad que tienen los anticuerpos marcados para unirse con alta especificidad a una determinada molécula blanco. Aquí, la marca unida al anticuerpo es una molécula fluorescente. El anticuerpo marcado se hace reaccionar contra un preparado biológico y luego se expone la muestra tratada a una fuente de luz de onda corta la cual genera un fenómeno de fluorescencia en la molécula marcadora que a su vez emite luz a una longitud de onda más larga. La luz emitida puede ser observada por medio de un microscopio de fluorescencia [71].

Procedimiento

- a) Cultivo celular. Cultivos dispersos o confluentes se sembraron en placas de 35 mm sobre un cubreobjetos estéril de 22 x 22 mm.
- b) Fijación. Después de 48 h de cultivo, las células se fijaron con paraformaldehído al 3.5% por 2 h a 4 °C.
- c) Permeabilización y bloqueo. Las células fijadas se permeabilizaron con Tritón X-100 frío al 0.05% por 5 min a TA. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con PBS 1X frío y se bloqueó con BSA al 5% en una cámara húmeda por 1 h a TA.
- d) Inmunodetección. Se agregaron 100 µL de anticuerpo primario anti-AhR (1:200; RPT1, Abcam, Cambridge, MA, USA) disuelto en BSA al 5%, el cual se incubó por 2 h a TA en una cámara húmeda. Finalizado el tiempo, se lavaron 12 veces con Tween-20 al 0.5% y 6 veces con PBS 1X. Posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario marcado con Alexa 488 (1:20; A-11001, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA), disuelto en BSA al 5%, por 1 hora a TA en una cámara húmeda y protegido de la luz. A continuación, se realizaron lavados bajo el esquema antes mencionado. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de Rodamina-Faloidina (1:20) y se incubó por 15 min a TA. Las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se dejaron secar por 10 min protegidas de la luz. Finalmente, las células se montaron con Vectashield con DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). El análisis confocal se realizó en un sistema Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Reactivos y soluciones

- Paraformaldehído al 3.5%

Paraformaldehído	3.50	g
Aforo (PBS 1X)	1.00	L
pH	7.4	

- Tritón X-100 0.05%

Tritón X-100	0.05	mL
Aforo (PBS 1X)	100.00	mL

- BSA 5%

BSA	5.00 g
Aforo (PBS 1X)	100.00 mL

- Tween-20 0.5%

Tween-20	0.50 mL
Aforo (PBS 1X)	100.00 mL

5.10 Centrifugación por gradiente de sacarosa

Principio:

La centrifugación por gradiente de densidad de sacarosa es el método más común usado para separar organelos intracelulares (e.g. endosomas y núcleos, entre otros). La densidad de los organelos depende de su contenido, tamaño, forma y de la relación lípido:proteína. Durante la centrifugación, los organelos flotan o sedimentan en una zona de densidad similar en el gradiente [72].

Procedimiento:

- a) Cultivo celular. Se sembraron cultivos dispersos y confluentes en medio DMEM completo.
- b) Cosecha. Después de 48 h de cultivo, se aspiró el medio y se lavó dos veces con PBS 1X frío. Las células se cosecharon en PBS 1X frío con ayuda de un raspador celular para posteriormente centrifugarlas a 2,000 rpm por 5 min.
- c) Obtención de extracto citoplásmico. La pastilla celular se resuspendió en 0.5 mL de solución amortiguadora de Tris-MgCl₂ (TM) y se incubó por 10 min en hielo. Posteriormente, se adicionaron 0.5 mL de Tritón X-100 al 2%, se mezcló suavemente y se incubó por 10 min en hielo. Al término de la incubación, se dieron 5-10 golpes con el pistilo B en un homogeneizador de Dounce (Thomas

Scientific, Swedesboro, NJ, USA) para eliminar los restos celulares adheridos a los núcleos. La suspensión se centrifugó a 7,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se recolectó el sobrenadante (que corresponde al extracto citoplásmico) y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

- d) Obtención de extracto nuclear. La pastilla obtenida en el paso anterior se resuspendió en 0.5 mL de solución amortiguadora de sacarosa I y 0.5 mL de solución amortiguadora de sacarosa II (proporción 1:1). Los núcleos contenidos en la solución anterior se purificaron mediante centrifugación por gradiente de sacarosa en un tubo Thinwall Ultra-Clear (344060, BeckmanCoulter, Brea, California, USA) de la siguiente manera: se depositaron 2 mL de solución amortiguadora de sacarosa II en el fondo del tubo, sobre esta cama de sacarosa se adicionó la suspensión nuclear y finalmente se adicionó 1 mL de solución amortiguadora de sacarosa I. Los tubos se pesaron (con sus respectivas tapas y camisas) con el fin de equilibrar el peso adicionando (cuando era necesario) solución amortiguadora de sacarosa I. Los tubos se sometieron a ultra centrifugación a 16,000 rpm durante 50 min a 4 °C. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y los núcleos purificados fueron resuspendidos en 100 µL de solución de lisis para someterlos a agitación en vortex (30 min a 4 °C) y sonicación (4 micrones durante 1 min con periodos de 15 seg de sonicación con descansos de 30 seg entre cada periodo). Para eliminar los restos de membrana, la suspensión se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min a 4 °C. Finalmente, se recolectó el sobrenadante (extractos nucleares) y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

Reactivos y soluciones:

-	Solución amortiguadora TM	
	Tris-HCl 100 mM pH 8	0.20 mL
	MgCl ₂ 41.9 mM	95.40 µL
	Inhibidor de proteasas 7X (Roche, Zwitterland)	28.50 µL
	Aforo (agua Milli Q)	2.00 mL

-	Tritón X-100 2%	
	Tritón X-100	0.20 mL
	Aforo (PBS 1X)	10.00 mL
-	Solución amortiguadora de sacarosa I	
	Sacarosa	1.09 g
	CaCl ₂ 1M	30.00 µL
	Mg(COO) ₂ 1M	20.00 µL
	EDTA 200 mM	5.00 µL
	Tris-HCl 1M pH 8.0	100.00 µL
	DTT 500 mM	20.00 µL
	PMSF 100 mM	50.00 µL
	Aforo (agua Milli Q)	10.00 mL
-	Solución amortiguadora de sacarosa II	
	Sacarosa	6.84 g
	Mg(COO) ₂ 1M	50.00 µL
	EDTA 200 mM	5.00 µL
	Tris-HCl 1M pH 8.0	100.00 µL
	DTT 500 mM	20.00 µL
	PMSF 100 mM	50.00 µL
	Aforo (agua Milli Q)	10.00 mL
-	Solución de lisis	
	Tris-HCl 1 M pH 8.0	50.00 µL
	NaCl 600 mM 250 µL	
	Inhibidor de proteasas 7X (Roche, Zwitterland)	142.00 µL
	Tritón X-100 10%	100.00 µL
	Aforo (agua Milli Q)	1.00 mL

5.11 Sincronización de células HeLa con hidroxiurea

Principio

La enzima ribonucleótido reductasa participa en la síntesis de deoxiribonucleótidos (dNTPs). Los dNTPs a su vez son necesarios para la síntesis de DNA, por lo que su disminución bloquea este proceso. La hidroxiurea (HU) es un potente inhibidor de la ribonucleótido reductasa, por lo tanto, el tratamiento con este compuesto químico bloquea reversiblemente la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S. Esto se ve reflejado en un paro del ciclo celular en la frontera de la fase G1/S en diversas líneas celulares [73-75]. Por lo anterior, el tratamiento con HU permite evaluar la progresión sincrónica del ciclo celular una vez que se ha retirado dicho tratamiento.

Procedimiento

Se trataron cultivos dispersos con 2 mM de HU por 16 h. Concluido el tiempo de tratamiento, las células se lavaron una vez con PBS 1X para posteriormente incubarlas con medio completo sin HU. A partir de este momento (0 h post-HU), las células se cosecharon con tripsina a los tiempos indicados para evaluar el ciclo celular mediante la tinción con Ioduro de Propidio (IP) y citometría de flujo.

5.12 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Principio:

El análisis del ciclo celular es un método que emplea la citometría de flujo para distinguir células en diferente fase del ciclo celular. Mediante el uso de un colorante fluorescente con capacidad de teñir el DNA, usualmente ioduro de propidio (IP), se puede determinar la cantidad de material genético de una célula. Como el contenido de DNA se duplica en la fase S del ciclo celular, la cantidad relativa de células en la fase G₀/G₁, S y G₂/M se puede determinar mediante la tinción con IP, de este modo, la intensidad de fluorescencia será directamente proporcional al contenido de DNA [76].

Procedimiento

- a) Cosecha. Se colectó el medio del cultivo celular en un tubo de 5 mL para recuperar las células que pudieran estar flotando. Posteriormente, las células adheridas se incubaron con tripsina-EDTA por 3 min a 37 °C. Al término de la incubación, las células se colocaron en el tubo de 5 mL.
- b) Lavado. Los tubos se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió con 1 mL de PBS 1X frío. La suspensión celular se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min.
- c) Fijación. El sobrenadante se decantó. Las células se resuspendieron con el sobrenadante que quedó en las paredes del tubo y se adicionaron 0.5 mL de etanol frío al 70% con agitación continua. Las células se colocaron en hielo por mínimo 1 h.
- d) Permeabilización celular. La suspensión celular se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min. Se recuperó la pastilla celular y se resuspendió con 2 mL de PBS 1X frío. La suspensión celular se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 0.5 mL de PBS 1X frío más 0.25 mL de solución de permeabilización fría. Se incubaron por 1 min a TA.
- e) Tinción. Las células se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 0.5 mL de solución de tinción (IP/RNAsa).
- f) Citometría de flujo. Las células se midieron con el equipo FACS Calibur (Becton Dickinson, CA, USA), por lo menos 20×10^3 eventos. Los datos se analizaron con el software ModFit (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

Reactivos y soluciones

- Solución de permeabilización
 - Na₂HPO₄ 0.2 M 48 mL
 - Ácido cítrico 0.1 M 2 mL

-	Solución de tinción	
	PBS 1X	10 mL
	IP (1mg/mL)	200 µL
	RNAasa (10 mg/mL)	73 µL

5.13 Inhibición de la IDO con Epacadostat

Principio:

El Epacadostat (INCB024360) inhibe a la IDO al formar un enlace covalente con el hierro del grupo hemo de la enzima, mientras que el grupo *m*-Br-fenil se une al sitio activo de la IDO [77].

Procedimiento:

Se trataron cultivos confluentes con Epacadostat 5 µM o DMSO por 48 h. De estos cultivos se sembraron cultivos dispersos manteniendo el tratamiento con Epacadostat o DMSO. Dichos cultivos dispersos se mantuvieron por 12 h (tiempo necesario para que las células se adhieran a su sustrato) para posteriormente fijarlos con paraformaldehído y evaluar la localización sub-celular del AhR mediante inmunofluorescencia como se indicó anteriormente.

5.14 Curva de crecimiento de células HeLa

Procedimiento:

- Cultivo celular. Se sembraron 1×10^4 células por pozo en placas de 6 pozos, se realizó el tratamiento correspondiente por triplicado, y se evaluó el crecimiento celular cada 24 h por 6 días.
- Cosecha. Las células se despegaron con 0.4 mL de tripsina, se lavó cada placa con 1.5 mL de medio, se colocó la suspensión celular en tubos de 5 mL y se centrifugaron a 2,000 rpm por 10 min a 21 °C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 1 mL de medio.

- c) Conteo celular. Las células de la suspensión anterior se contaron en un hemocitómetro empleando azul de tripano al 0.04%. Se contaron células viables y no viables.

La concentración inhibitoria media (IC₅₀) se calculó con el *dynamic curve fitting algorithm* del programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., CA, USA).

5.15 Apoptosis por anexina V y IP

Principio:

La anexina V es una proteína que se une específicamente al fosfolípido fosfatidil serina, el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y se expone en la cara externa de dicha membrana cuando comienza el proceso de apoptosis. La anexina V conjugada con FITC tiñe las células tanto apoptóticas como necróticas por lo que es necesario adicionar IP para diferenciarlas [78].

Procedimiento:

- a) Cultivo celular. Se sembraron 10⁶ células en un volumen final de 4 mL en cajas de 60 mm de diámetro. A las 24 h se inició el tratamiento.
- b) Cosecha. Concluido el tiempo de tratamiento, se recuperó el medio en tubos de 5 mL y se centrifugaron a 1,000 rpm por 5 min a 20 °C, se decantó el medio y se conservó la pastilla celular. A las células que siguieron adherentes a la caja de cultivo se les adicionó 1 mL de PBS 1X con EDTA al 0.02%, y se incubó a 37 °C por un min. Con ayuda de un raspador celular se recuperaron las células, se colocaron en los tubos de 5 mL antes mencionado y se adicionaron 3 mL de PBS 1X frío. Los tubos se centrifugaron a 1,000 rpm por 5 min a 20 °C y se decantó el sobrenadante.
- c) Tinción de células apoptóticas con Anexina-V-FITC/IP. Para la detección de células apoptóticas se utilizó un kit comercial (Annexin-V-FluosStaining Kit, Roche Diagnostics, Indiana, USA). Se resuspendió la pastilla celular en 100 µL de solución amortiguadora de tinción más 0.4 µL de anexina V-FITC y 2 µL de IP. Se incubó durante 15 min a TA en oscuridad. Las células se midieron con un

equipo FACS Calibur (Becton Dickinson, CA, USA), y los datos se analizaron con el software FlowJo 10.0.

5.16 Generación de células HeLa *AhR*-KO mediante CRISPR-Cas9

Principio:

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente inter-espaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés), y los genes asociados a CRISPR (Cas, por sus siglas en inglés), son secuencias de DNA que forman parte del sistema inmune adaptativo microbiano contra virus invasores. Dicho sistema está constituido por dos RNAs y un componente proteínico: un RNA codificado por las CRISPR (crRNA) el cual se une al DNA viral, un RNA que facilita el procesamiento del crRNA (tracrRNA) y una nucleasa llamada Cas9, la cual es capaz de interactuar con el complejo de RNA:DNA y realizar un corte específico en el DNA. Este sistema ha sido re-diseñado para la edición de genes al combinar el crRNA y el tracrRNA en una unidad quimérica llamada *single-guide RNA* (sgRNA). Por lo tanto, el sgRNA detecta una secuencia específica en el genoma, haciendo posible que la enzima Cas9 se una al sgRNA y realice un corte en el DNA en un sitio de interés. Cuando el DNA es cortado, éste es reparado mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) o mediante recombinación homóloga generando inserciones, deleciones o mutaciones en el DNA. De esta manera, es posible editar genes para evaluar su función en los organismos [79, 80].

En este experimento se emplearon dos sgRNAs dirigidos contra el exón 1 del gen que codifica para el AhR humano. Con los cortes en el DNA realizados por la enzima Cas9, se espera la deleción de un fragmento de 84 pb debido a la reparación del DNA por NHEJ.

Procedimiento:

- a) Cultivo celular. Se sembraron por triplicado 1×10^5 células HeLa en un volumen final de 2 mL en placas de 6 pozos. Después de 24 h de cultivo se realizó la transfección.
- b) Transfección. Tres μg de cada uno de los plásmidos pMLM3636-hAhRsgRNA93 y pMLM3636-hAhRsgRNA96 (proporcionados por el Dr. Fernández-Salguero de la Universidad de Extremadura, España), y 12 μg del plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (obsequio del Dr. Feng Zhang, Addgene plasmid # 48138) se disolvieron en 750 μL de medio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA). Posteriormente, se agregaron 68 μL de TurboFectin 8.0 (OriGen, Rockville, USA), se disolvió suavemente por pipeteo y se incubó a TA por 30 min. Transcurrido este tiempo, se depositaron 250 μL de la mezcla anterior a cada pozo. Como control negativo de la generación de células HeLa *AhR*-KO mediante CRISPR-Cas9, la transfección se realizó como se indica arriba con el vector vacío pMLM3636 más el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458).
- c) Generación de cultivos monoclonales a partir de células HeLa GFP positivas. El aislamiento de células HeLa GFP positivas se realizó 48 h después de la transfección mediante *cell sorting*. Para obtener cultivos monoclonales, las células aisladas se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de una célula por pozo. Después de 30 días de cultivo se extrajo DNA genómico (gDNA) para su genotipificación.
- d) Purificación de gDNA. Para obtener gDNA, las células se lisaron empleando 200 μL de solución amortiguadora de lisis adicionada con 100 μg de proteinasa K. Tras una incubación a 56 °C durante 1 h, las muestras se mantuvieron a 95 °C por 10 min. Finalmente, se centrifugaron a 13,000 rpm por 1 min, se recolectó el sobrenadante (el cual contiene el gDNA) y se almacenó a -70 °C hasta su uso.
- e) Genotipificación por PCR punto final. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 67.9 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 2.5 min. Posteriormente se realizó un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min. Al término de la reacción de PCR las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 1% para identificar

fragmentos indicativos de la deleción esperada (437 pb: *AhR*-WT; 353 pb: *AhR*-KO). La secuencia de los oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR son los siguientes: sentido 5'-ATCTGGGCGGGGCGGGGCCGGTG-3' y anti-sentido 5'-AGGTGCCGTCTACACCGGCGGAG-3'.

Reactivos y soluciones

-	Solución amortiguadora de lisis	
	Tris-HCl	47 mg
	KCl	112 mg
	NP40 0.45%	135 µL
	Tween-20	135 µL
	Aforo (Agua Milli Q)	30 mL
	pH	8

5.17 Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias entre las muestras control y las muestras problemas se determinaron usando la prueba t-student y la prueba ANOVA (SigmaPlot 12.0). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

6. RESULTADOS

6.1 Expresión y funcionalidad del AhR en células HeLa

Para determinar si el AhR se expresa en células HeLa, se extrajo proteína total de esta línea celular y mediante western-blot se evaluó la presencia de este factor de transcripción. Como control positivo de la expresión del AhR, se empleó la línea celular HepG2, en la cual se ha reportado su expresión [81]. Como se observa en la figura 5, el AhR se expresa en las células HeLa con niveles de proteína similares a los detectados en las células HepG2.

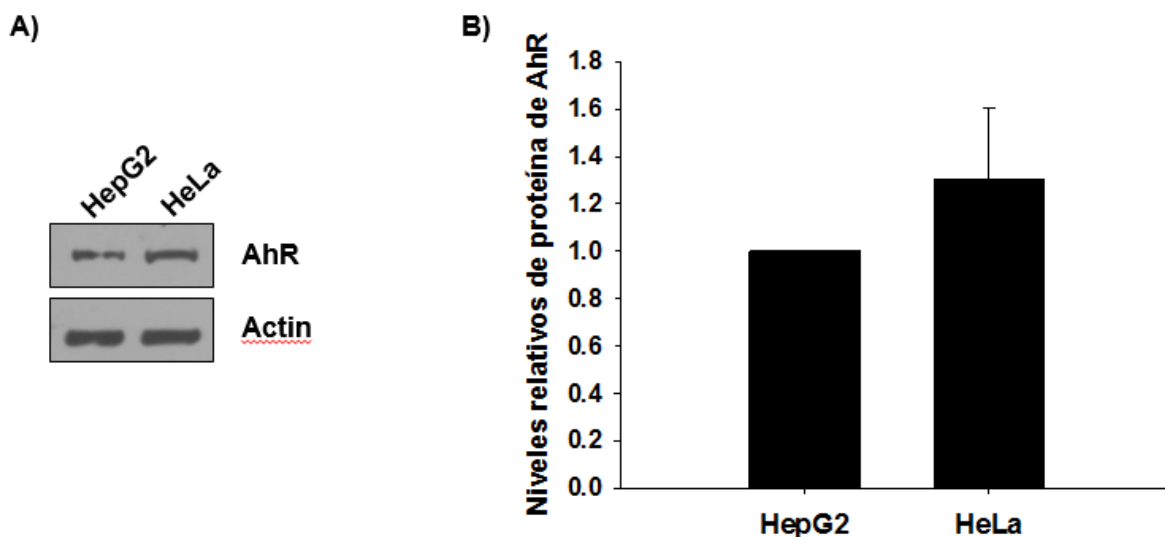


Figura 5. Expresión del AhR en células HeLa y HepG2. A) Blot representativo de la inmunodetección del AhR por western-blot en células HepG2 y HeLa. B) Densitometría de 3 western-blots independientes. Los resultados se expresan como el promedio \pm D.E.

Posteriormente se evaluó la funcionalidad del AhR en las células HeLa. Dado que la expresión del gen *CYP1A1* es dependiente de la actividad transcripcional del AhR, se evaluó mediante PCR cuantitativo la inducción de la expresión del mRNA de este gen en células HeLa tratadas con β -NF, ligando agonista del AhR. Como se puede observar en la figura 6, el tratamiento con β -NF indujo hasta cuatro veces los niveles de mRNA

del CYP1A1 con respecto a su control. Este resultado indica que el AhR es transcripcionalmente activo en las células HeLa.

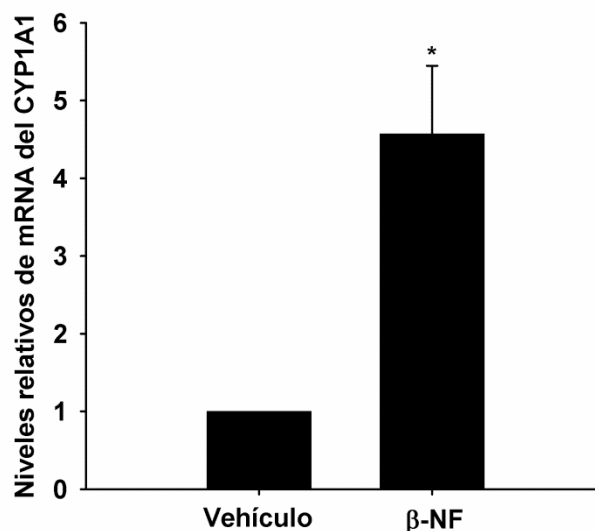


Figura 6. La activación del AhR mediada por la β -NF incrementa los niveles de mRNA del CYP1A1 en células HeLa. Células HeLa fueron tratadas con 1 μ M de β -NF por 2 h y los niveles de mRNA del CYP1A1 fueron determinados por qPCR. Los datos son presentados como el promedio \pm D.S. de dos experimentos independientes. * p <0.05.

6.2 Caracterización de la localización sub-celular del AhR en células HeLa

Ikuta y colaboradores [56] reportaron que, la localización sub-celular del AhR en ausencia de ligando exógeno, es predominantemente nuclear en cultivos dispersos de células HaCat, es decir, células cultivadas en condiciones de baja densidad celular, mientras que en cultivos confluentes, la localización del AhR es predominantemente citoplásmica. Considerando lo anterior, el siguiente objetivo fue evaluar la localización sub-celular del AhR, mediante inmunofluorescencia y fraccionamiento celular por gradiente de sacarosa, en cultivos dispersos y confluentes de células HeLa en ausencia de ligando exógeno. En la figura 7A se muestra una imagen representativa de contraste de fases de cultivos en ambas condiciones de confluencia, así como la localización del AhR mediante inmunofluorescencia. Se observa que el AhR se localiza predominantemente en citoplasma en la condición de cultivo confluyente (~90% de las

células analizadas, Figura 7B), mientras que su localización en núcleo es predominante en cultivo disperso (100% de las células analizadas, Figura 7B). La detección del AhR mediante western-blot en extractos nucleares y citosólicos corroboró las observaciones realizadas a través de microscopía confocal (Figura 7C).

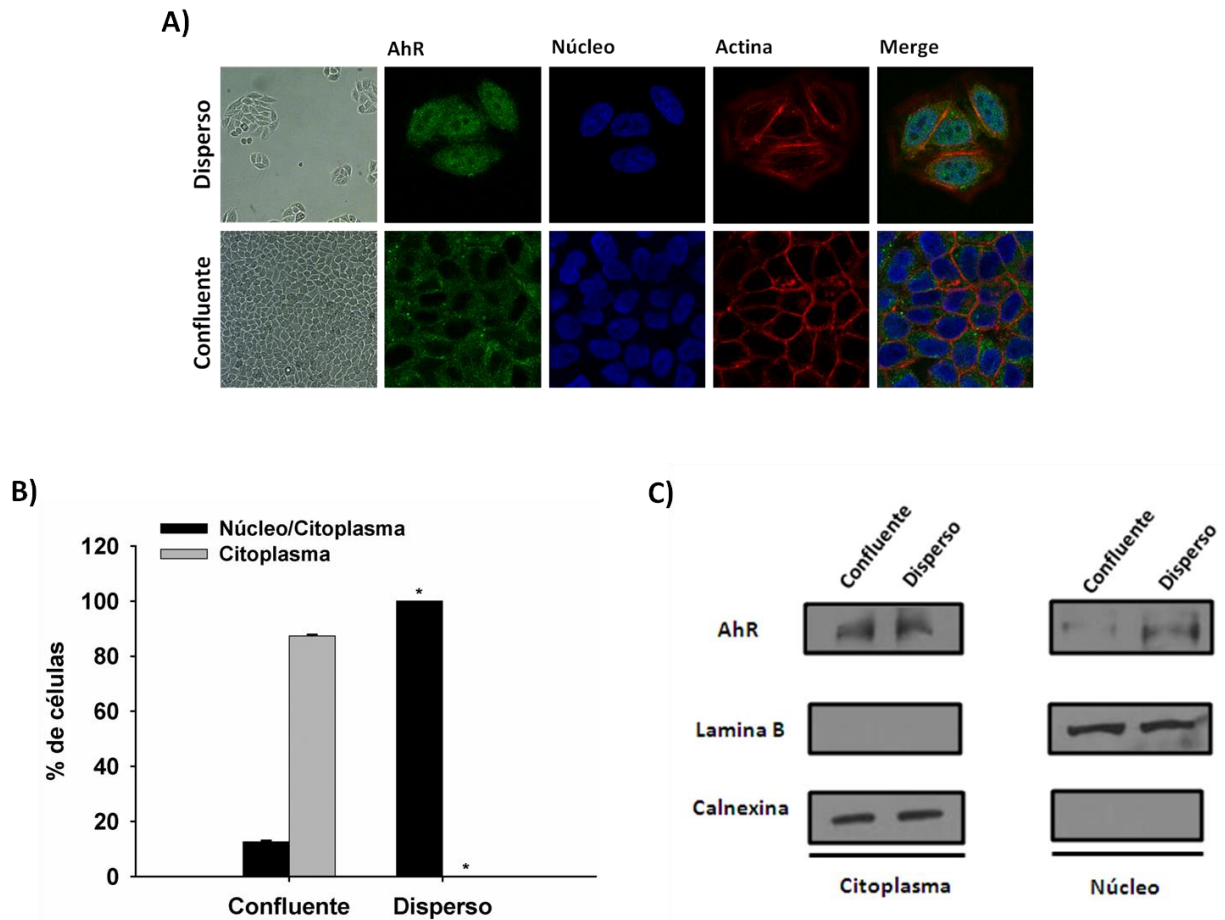


Figura 7. La densidad celular determina la localización sub-celular del AhR en células HeLa. A) Localización del AhR determinada por microscopía confocal en cultivo disperso y confluyente. La figura de contraste de fases (extrema izquierda) corresponde a un campo representativo del cultivo. El AhR, los núcleos y la actina se visualizan en verde, azul y rojo, respectivamente. B) Porcentaje de células en cultivo confluyente y disperso con AhR en citoplasma o en núcleo/citoplasma. Los datos son presentados como promedio \pm D.S. de dos experimentos independientes. * $p < 0.01$. C) Inmunodetección del AhR por western blot en extractos citoplásmicos y nucleares de cultivos dispersos y confluentes.

Adicionalmente, se analizó la posibilidad de que la localización nuclear del AhR en cultivo disperso se deba en parte a una distribución asociada a las distintas fases del

ciclo celular. Para ello, primero se sincronizaron células HeLa en la frontera de las fases G1/S mediante el tratamiento con HU. Una vez retirado el tratamiento con el agente citostático, se siguió la progresión del ciclo celular por medio de la tinción con IP y citometría de flujo. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 8. Como era de esperarse, la mayoría de la población celular se encuentra en la fase G1 (67%) a las 0 h posteriores al tratamiento con HU, con una minoría (33%) en la fase S, mientras que la población celular en la fase G2/M es prácticamente inexistente (0%). Estos datos sugieren que las células se encuentran en la frontera de las fases G1/S. Al continuar con el análisis de la progresión del ciclo celular, se observa que a las 4 h posteriores al tratamiento con HU, el 100% de las células están en la fase S, mientras que a las 8 h la gran mayoría en la fase G2/M (90%) (Figura 8).

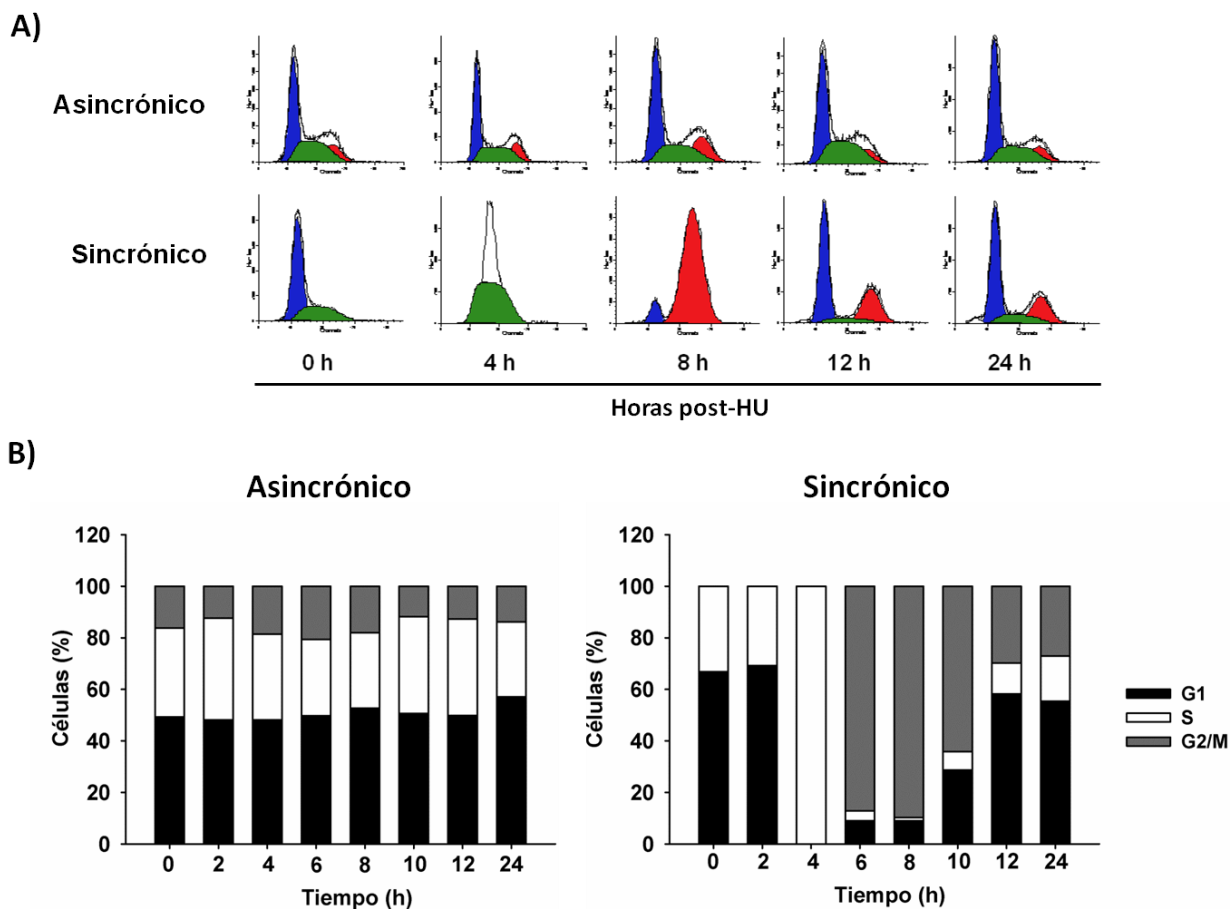


Figura 8. Sincronización de cultivos dispersos de células HeLa. A) Perfil del ciclo celular determinado por citometría de flujo en células HeLa sincronizadas con HU. Las células se trataron por 18 h con 2 mM de HU. Al término de este tratamiento, se cambió el medio por medio fresco sin HU y se evaluó el perfil del ciclo celular a los tiempos indicados. B) Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. Los datos son presentados como promedio de tres experimentos independientes.

Con base en las observaciones anteriores, se procedió a evaluar la localización sub-celular del AhR mediante inmunofluorescencia en cultivos dispersos a las 0, 4 y 8 h posteriores al tratamiento con HU, donde la mayoría de la población celular se encuentra en las fases G1, S y G2/M del ciclo celular, respectivamente. En la figura 9, se muestra la localización sub-celular del AhR en cultivos dispersos asincrónicos, así como en cultivos dispersos en las fases G1, S y G2/M del ciclo celular. Como se aprecia, el AhR se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma de células HeLa en

cultivos dispersos en todas las condiciones evaluadas, sin observarse un cambio en su distribución en función de la fase del ciclo celular en que se encuentran.

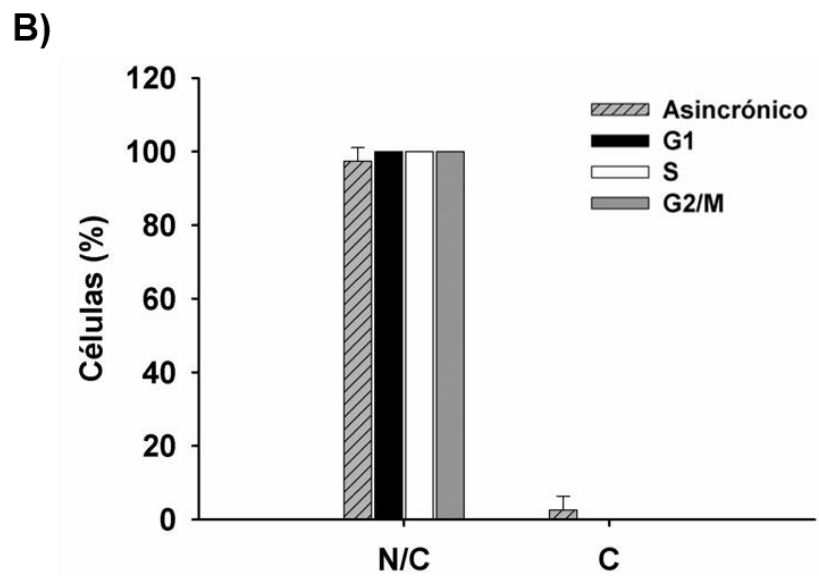
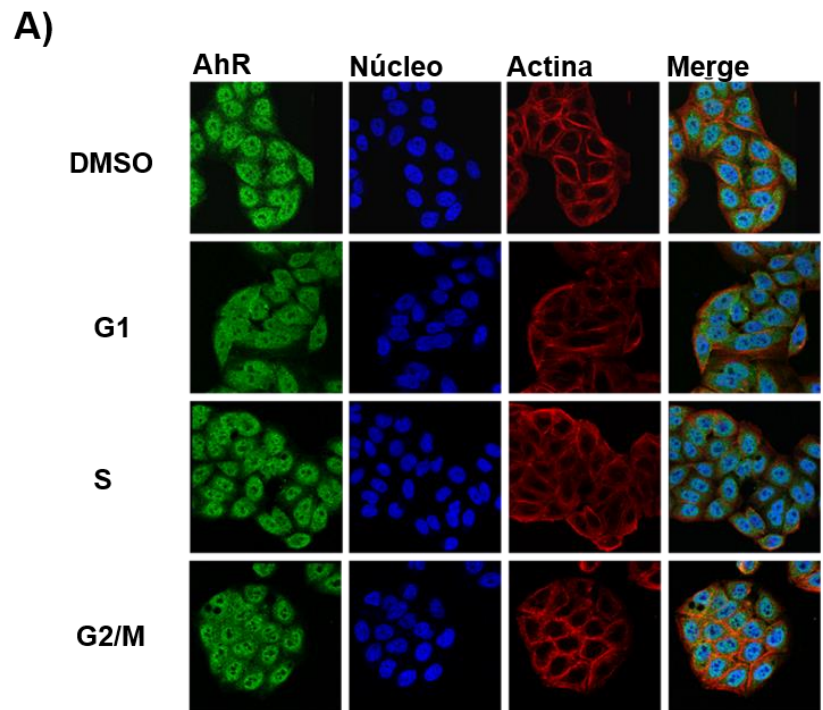


Figura 9. Localización celular del AhR en células HeLa en diferentes fases del ciclo celular. A) Localización sub-celular del AhR en cultivo disperso en las diferentes fases del ciclo celular, determinada por microscopía confocal. El AhR, los núcleos y la actina se visualizan en verde, azul y rojo respectivamente. B) Porcentaje de células en cultivo disperso con AhR nuclear y citoplásmico (N/C) o AhR citoplásmico (C), en las diferentes fases del ciclo celular. Los datos son presentados como promedio \pm D.S. de tres experimentos independientes.

En su conjunto, estos datos indican que las fases del ciclo celular no determinan la localización nuclear del AhR en células HeLa y sugieren que la localización sub-celular del AhR está determinada por la densidad celular, siendo citoplásmico en cultivo confluyente, y predominantemente nuclear en cultivo disperso.

6.3 La densidad celular determina los niveles de expresión del CYP1A1 en células HeLa

Considerando que la presencia del AhR en el núcleo es fundamental para que lleve a cabo su función como factor de transcripción, se analizó si la localización nuclear del AhR en cultivo disperso y en ausencia de un ligando exógeno se traduce en un incremento de la expresión de su blanco canónico del AhR, el CYP1A1. Para ello, se midieron los niveles basales de mRNA del CYP1A1 en cultivos dispersos y confluentes (Figura 10A). Como se puede observar, la expresión del mRNA del CYP1A1 en el cultivo disperso es dos veces mayor con respecto al cultivo confluyente, lo que concuerda con la localización nuclear del AhR.

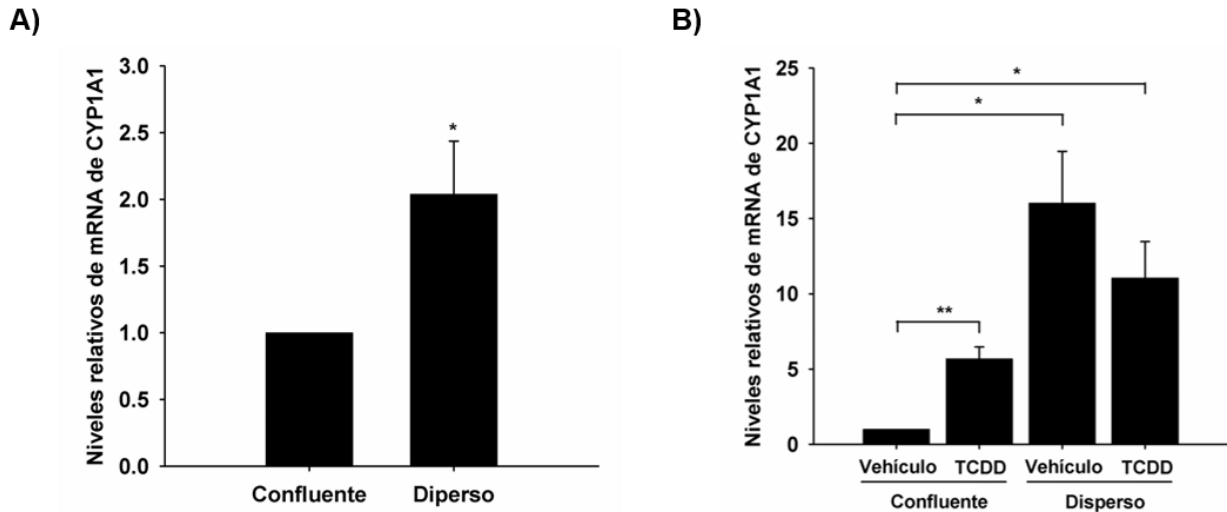


Figura 10. Expresión basal e inducida del mRNA del CYP1A1 en cultivos confluentes y dispersos de células HeLa. A) Niveles del mRNA del CYP1A1 en cultivo disperso y confluyente en ausencia de ligando exógeno. B) Efecto del TCDD (10 nM, 12 h) sobre la expresión del mRNA del CYP1A1 en cultivo disperso y confluyente. Los niveles de mRNA se determinaron por qPCR. Los datos son presentados como promedio \pm D.S. de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Posteriormente, se evaluó el efecto de un ligando agonista exógeno sobre los niveles de mRNA del CYP1A1. Para este fin, cultivos dispersos y confluentes, donde el AhR se encuentra en núcleo y citoplasma, respectivamente, fueron tratados con TCDD. En la figura 10B se observa que, en la condición de cultivo confluyente, el TCDD es capaz de inducir hasta cinco veces el mRNA del CYP1A1 con respecto a su control. En contraste, en el cultivo disperso no hubo cambios significativos en los niveles de mRNA del CYP1A1 entre las células tratadas con TCDD y las células control. Los resultados anteriores sugieren que: (i) el AhR que se encuentra en el citoplasma de células del cultivo confluyente se puede activar por el TCDD, y (ii) el TCDD no es capaz de activar al AhR del cultivo disperso, posiblemente debido a la ocupación de este por un putativo ligando endógeno.

Considerando los resultados anteriores, se procedió a evaluar la expresión basal del mRNA del CYP1A1 a lo largo de un gradiente de densidad celular. En la figura 11 se observa que los niveles de mRNA del CYP1A1 son mayores en las células cultivadas

bajo la condición de menor densidad celular, y disminuyen a medida que aumenta la confluencia.

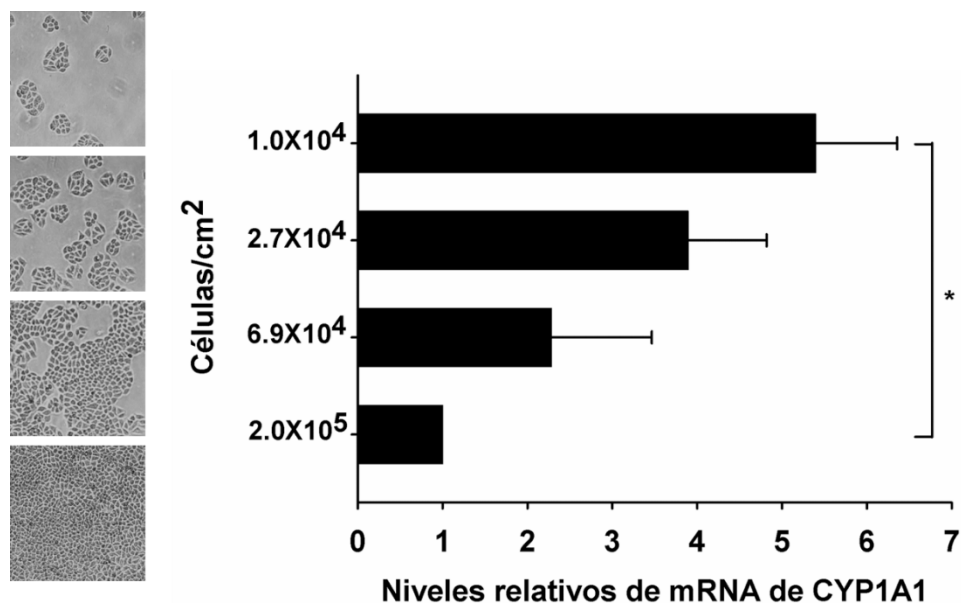


Figura 11. Expresión basal del mRNA del CYP1A1 en células HeLa cultivadas a diferentes densidades. Las figuras de contraste de fases (extrema izquierda) corresponden a un campo representativo de los cultivos señalados en el eje de las ordenadas de la gráfica. Los niveles de mRNA se determinaron por qPCR. Los datos son presentados como promedio \pm D. S. de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$

En conjunto, estos resultados indican que la localización sub-celular del AhR en células HeLa, modula la expresión basal del mRNA del CYP1A1, y determina su inducción mediada por ligandos exógenos como el TCDD.

6.4 Inhibición de laIDO y localización sub-celular del AhR

Debido a que la enzima IDO participa en la biosíntesis de la kinurenina y ácido kinurénico [57, 58], ligandos agonistas del AhR, se decidió estudiar el efecto del bloqueo de la síntesis de dichos ligandos endógenos sobre la localización nuclear del AhR en cultivo disperso. Para ello, cultivos confluentes de células HeLa (donde el AhR se localiza en citoplasma) fueron pre-tratados con un inhibidor de la IDO, Epacadostat (5 μ M, 48 h). Posteriormente, a partir de este cultivo se sembraron las células a una

densidad celular equivalente a la condición dispersa. Con lo anterior, se bloqueó la síntesis de ligandos endógenos derivados del triptófano que pudieran activar al AhR y promover su internalización nuclear. Como era de esperarse, el AhR se localiza en el citoplasma de las células HeLa en cultivo confluyente, a las 0 y 48 h de tratamiento con Epacadostat, sin observarse diferencias con su control DMSO (Figura 12A). En la figura 12B, se observa que en el cultivo disperso (proveniente del cultivo confluyente de la figura 12A), el AhR se localiza predominantemente en el núcleo a las 12 h posteriores al tratamiento con el inhibidor de la IDO. Los resultados anteriores podrían indicar que la localización nuclear del AhR en cultivo disperso no se debe a la activación de este factor de transcripción por ligandos derivados del triptófano, ya que el efecto de la inhibición de la enzima encargada de la biosíntesis de dichos ligandos, no se ve reflejado en un cambio en la distribución nuclear del AhR.

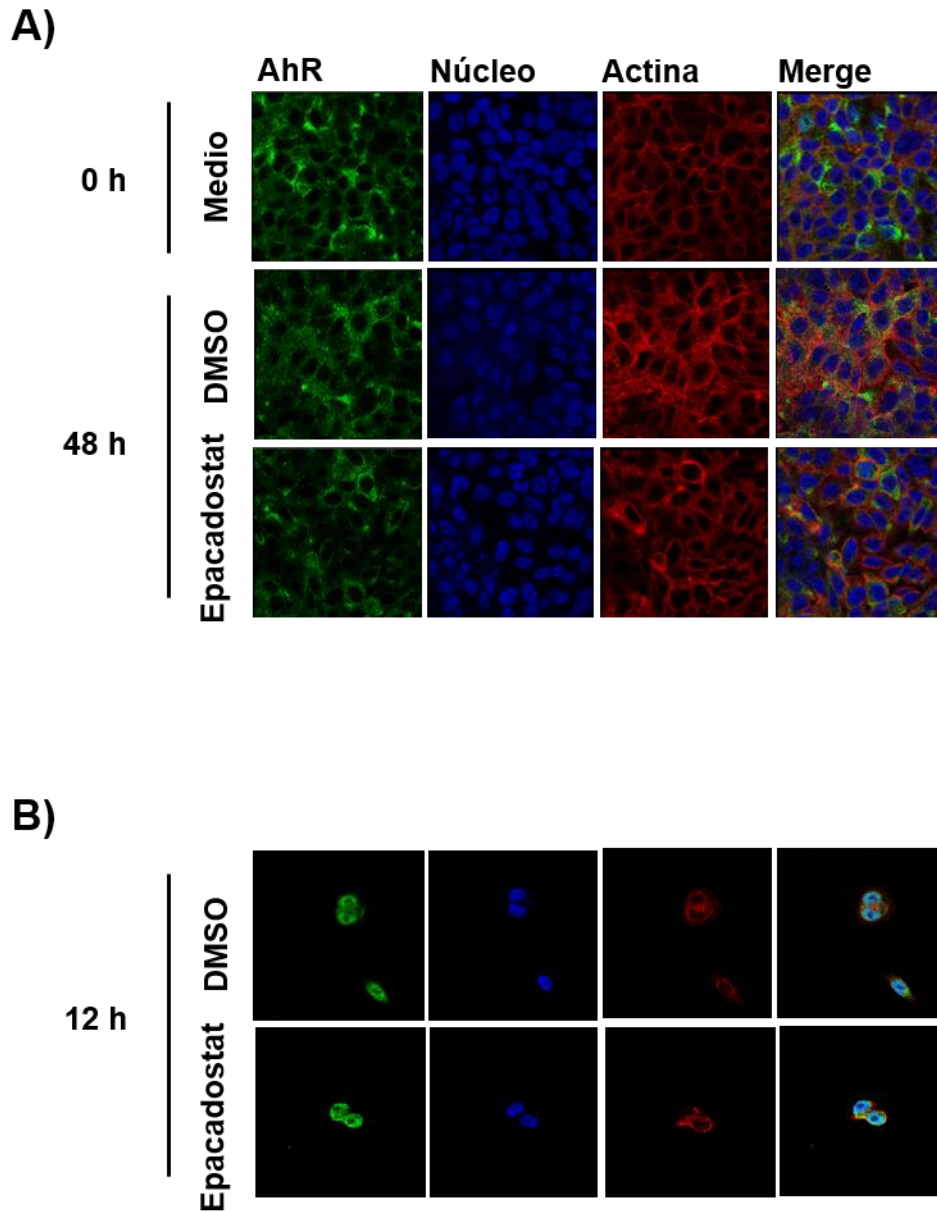


Figura 12. Efecto del Epacadostat sobre la localización sub-celular del AhR en células HeLa. A) Localización sub-celular del AhR en cultivos confluentes a las 0 h (panel superior) y 48 h de tratamiento con DMSO (panel intermedio) o Epacadostat 5 μ M (panel inferior). B) Localización sub-celular del AhR en cultivos dispersos (provenientes del cultivo confluyente de a las 12 h posteriores al tratamiento con DMSO (panel superior) y Epacadostat 5 μ M (panel inferior). El AhR, los núcleos y la actina se visualizan en verde, azul y rojo, respectivamente.

6.5 Efecto de la α -NF y del Resv sobre la proliferación celular, niveles de p53 y apoptosis en células HeLa.

Dado que se ha reportado la actividad antagonista de la α -NF y del Resv sobre el AhR en diversas líneas celulares [19, 20, 29-31], se determinó si dicho efecto se presentaba en las células HeLa. Primeramente se evaluó el efecto del tratamiento con α -NF y el Resv sobre la expresión basal del mRNA del CYP1A1, gen blanco canónico del AhR. Posteriormente, se investigó el efecto de estos 2 antagonistas sobre la inducción del mRNA del CYP1A1 provocada por la β -NF, agonista del AhR. La figura 13A indica que los tratamientos con α -NF y Resv provocaron una disminución significativa en los niveles basales del mRNA del CYP1A1 en cultivos dispersos, respecto a su control. Lo anterior sugiere que estos compuestos tienen la capacidad de antagonizar con posibles ligandos endógenos. Como era de esperarse, la β -NF incrementó los niveles del mRNA del CYP1A1 hasta cuatro veces más con respecto a su control, mientras que los co-tratamientos con β -NF/ α -NF y β -NF/Resv inhibieron dicha inducción (Figura 13B).

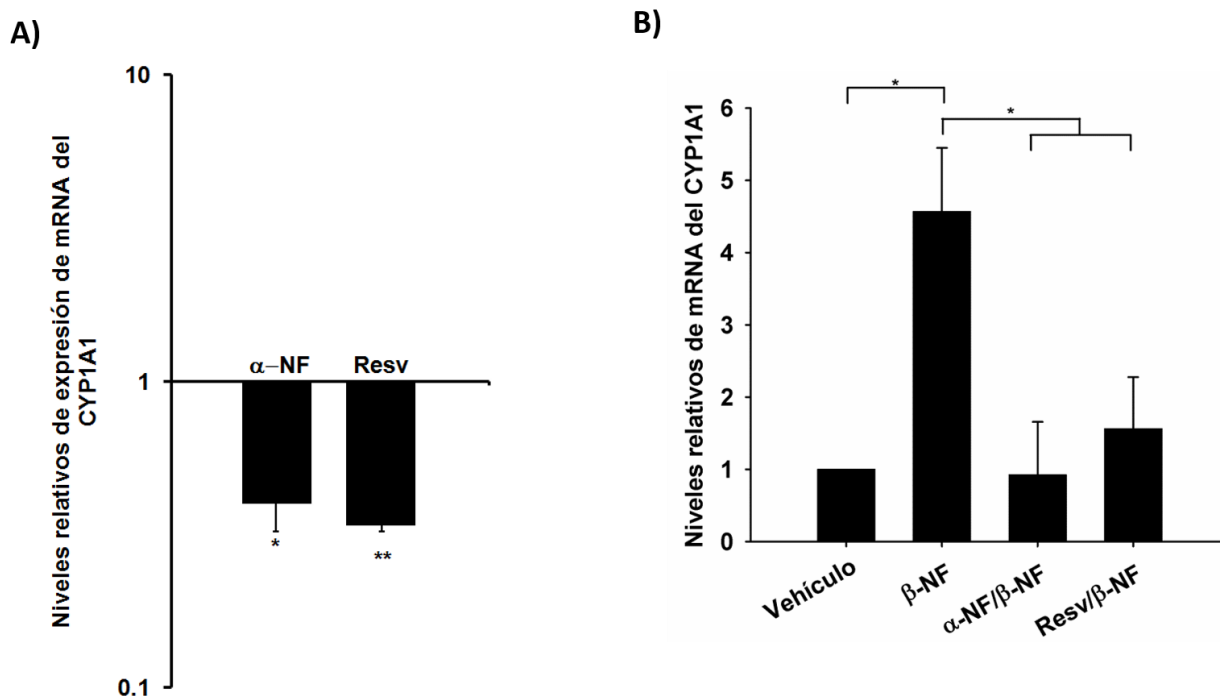


Figura 13. La α -NF y el Resv disminuyen los niveles basales e inducidos de mRNA del CYP1A1. A) Efecto de la α -NF (1 μ M) y Resv (5 μ M) sobre los niveles basales de mRNA del CYP1A1. Las células fueron tratadas con los antagonistas antes mencionados desde el momento de la siembra del cultivo disperso hasta su cosecha con TRizol® (tiempo total de tratamiento: 60 h). B) Efecto del tratamiento con α -NF (50 μ M) y Resv (40 μ M), en células HeLa, sobre los niveles de mRNA del CYP1A1 inducido por la β -NF (1 μ M). Las células fueron tratadas por 2 h con los ligandos antes mencionados. Los niveles de mRNA se determinaron por qPCR. Los datos son presentados como promedio \pm D.S. de tres experimentos independientes. * p <0.05, ** p <0.01.

Los resultados anteriores indican que la α -NF y el Resv bloquean la expresión del CYP1A1 inducida por el tratamiento con β -NF en cultivo confluyente. También disminuyen los niveles basales del CYP1A1 en cultivo disperso. Lo anterior establece que tanto la α -NF como el Resv actúan como antagonistas del AhR en células HeLa bajo las condiciones antes mencionadas.

Previamente, estudios realizados en cultivos confluentes de células WB-F344 (línea celular precursora de hepatocitos de rata), demostraron que la activación del AhR con TCDD provocaba la pérdida de la inhibición de la proliferación por contacto, dando como resultado un incremento en la proliferación celular [82]. Por otro lado, se ha observado

en fibroblastos embrionicos y hepatocitos primarios derivados del ratón *AhR*-KO, que la ausencia de este receptor resulta en una disminución de la proliferación celular [32, 47]. Por lo anterior, se decidió investigar si el AhR modula la proliferación de células HeLa. Para ello, se trataron cultivos dispersos con concentraciones crecientes de antagonistas del AhR durante 1 a 6 días. En la figura 14 se puede observar como el crecimiento celular de los controles se ajusta a un crecimiento exponencial, mientras que la proliferación celular se ve disminuida a medida que las concentraciones de α -NF y Resv aumentan, siendo evidente la inhibición de esta a partir de la concentración de 20 μ M para ambos compuestos.

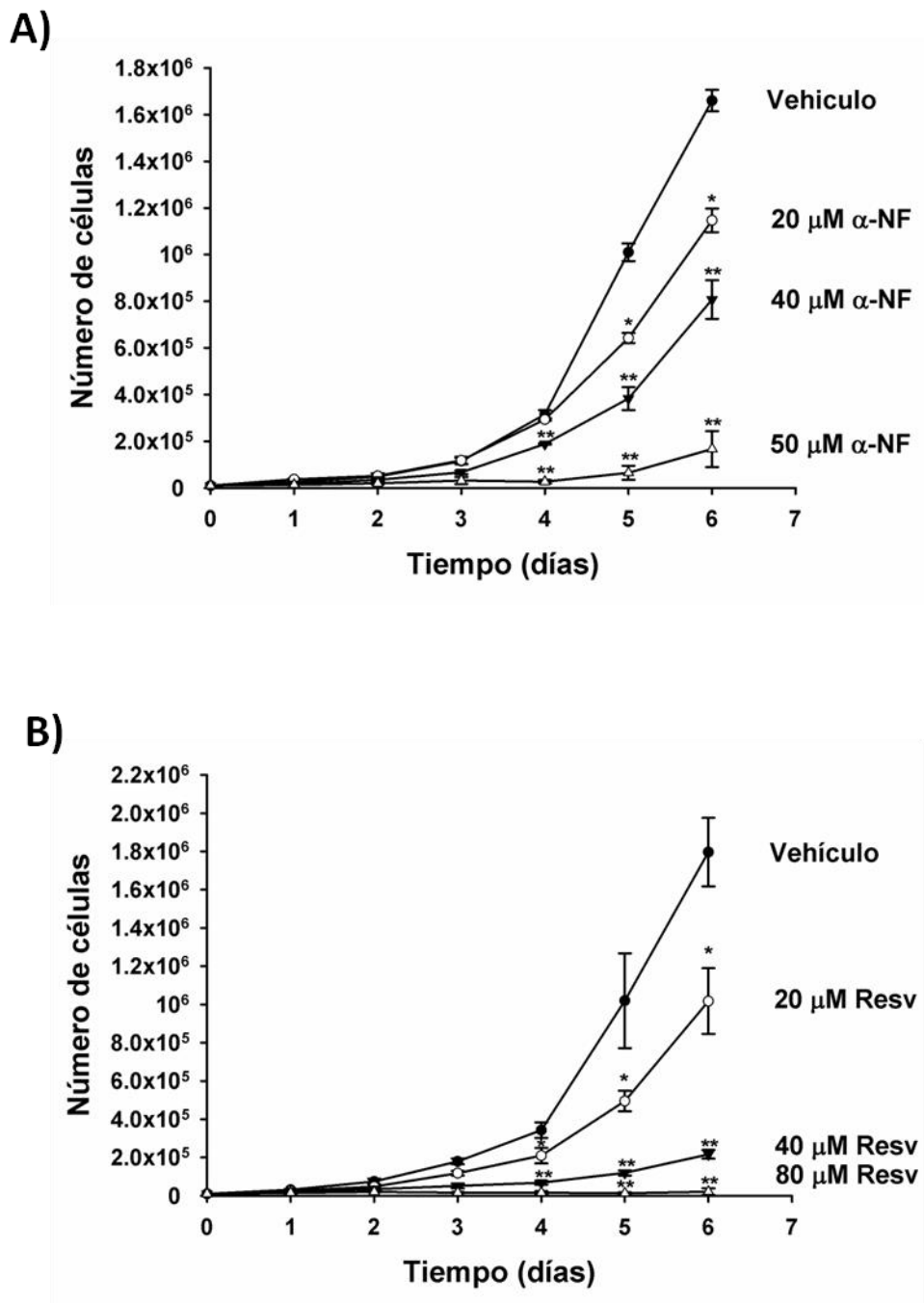


Figura 14. La α -NF y el Resv disminuyen la proliferación celular de células HeLa. Las células se trataron con α -NF (A) y Resv (B) a las concentraciones indicadas. Cada 24 h se cosecharon y se diluyeron en azul tripano para ser contadas en cámara de Neubauer. Los datos son presentados como promedio \pm D.S. de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

De las curvas de crecimiento anteriores se calculó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) (concentración capaz de inhibir la proliferación celular al 50% con respecto a su control) y el tiempo de duplicación celular (TDC). Como se observa en la figura 15, los valores de la CI_{50} para ambos antagonistas, α -NF y Resv, están en el rango micromolar. Sin embargo, el tratamiento con Resv tuvo un efecto mayor en la inhibición de la proliferación celular ($CI_{50}= 21.76 \mu\text{M}$) con respecto a la α -NF ($CI_{50}= 36.81 \mu\text{M}$).

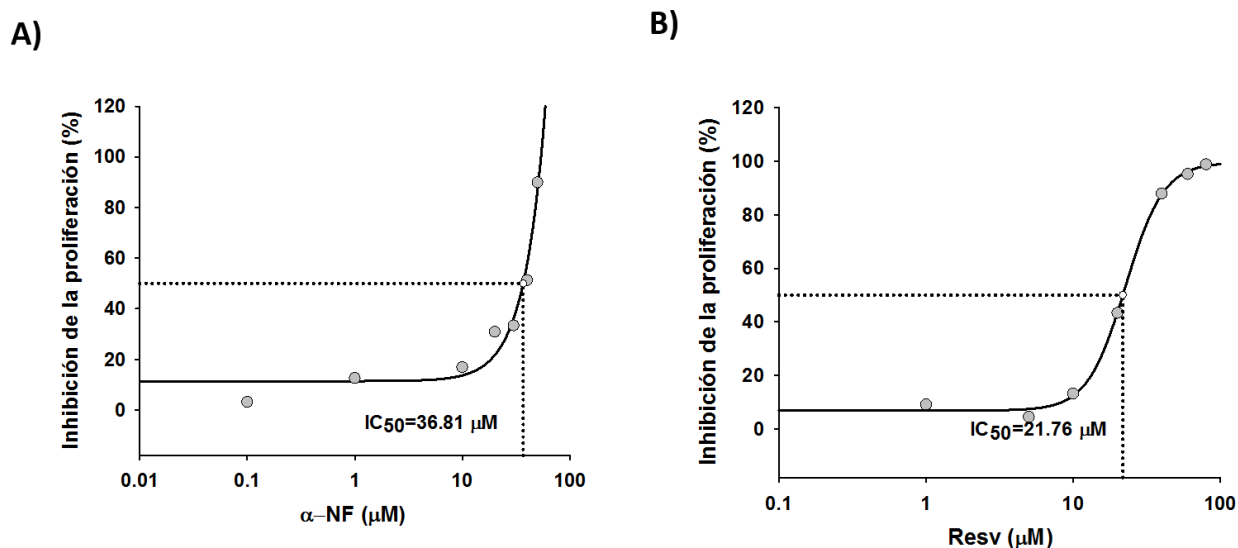


Figura 15. IC_{50} de la α -NF y del Resv. (A) La α -NF inhibe la proliferación celular de células HeLa con una IC_{50} de $36.81 \mu\text{M}$. (B) El Resv inhibe la proliferación celular de células HeLa con una IC_{50} de $21.76 \mu\text{M}$. Los valores de la CI_{50} fueron calculados usando los datos del día 6 del ensayo de proliferación celular.

El TDC se calculó con la siguiente fórmula:

$$t_d = \log 2 * (t_2 - t_1) / \log\left(\frac{X_2}{X_1}\right)$$

Los TDC, calculados en la fase exponencial de crecimiento del cultivo celular, se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Efecto de la α -NF sobre el TDC en células HeLa.

α -NF (μ M)	TDC (horas)	Desviación Estándar (horas)
DMSO	19.42	± 1.21
20	20.23	± 0.50
40*	24.21	± 2.02
50*	42.80	± 5.27

* $p < 0.05$

Tabla 2. Efecto del Resv sobre el TDC en células HeLa.

Resv (μ M)	TDC (horas)	Desviación Estándar (horas)
DMSO	17.09	± 1.90
20*	20.60	± 1.60
40*	32.10	± 1.57
80**	-	-

* $p < 0.05$

**Con la concentración de 80 μ M no fue posible calcular el TDC debido a que el tratamiento inhibió por completo la proliferación celular.

Estos resultados indican que el tratamiento con antagonistas del AhR incrementan el TDC cercano al doble con respecto a los controles.

Con base en las observaciones anteriores, se evaluó si la inhibición de la proliferación celular se veía acompañada de un incremento en los niveles de apoptosis. Como control positivo para la determinación de dicho proceso celular, se trataron células HeLa con etopósido (ET), un compuesto químico inductor de apoptosis [83]. En la figura 16 se muestra el efecto del tratamiento con α -NF (50 μ M) sobre los niveles de muerte celular programada en cultivos dispersos de células HeLa. El tratamiento provocó un incremento significativo en los niveles de apoptosis de alrededor del 20% en todos los tiempos probados. En contraste, el Resv (40 μ M) incrementó los niveles de apoptosis progresivamente, alcanzándose hasta un 45% de células en dicha condición (Figura 17).

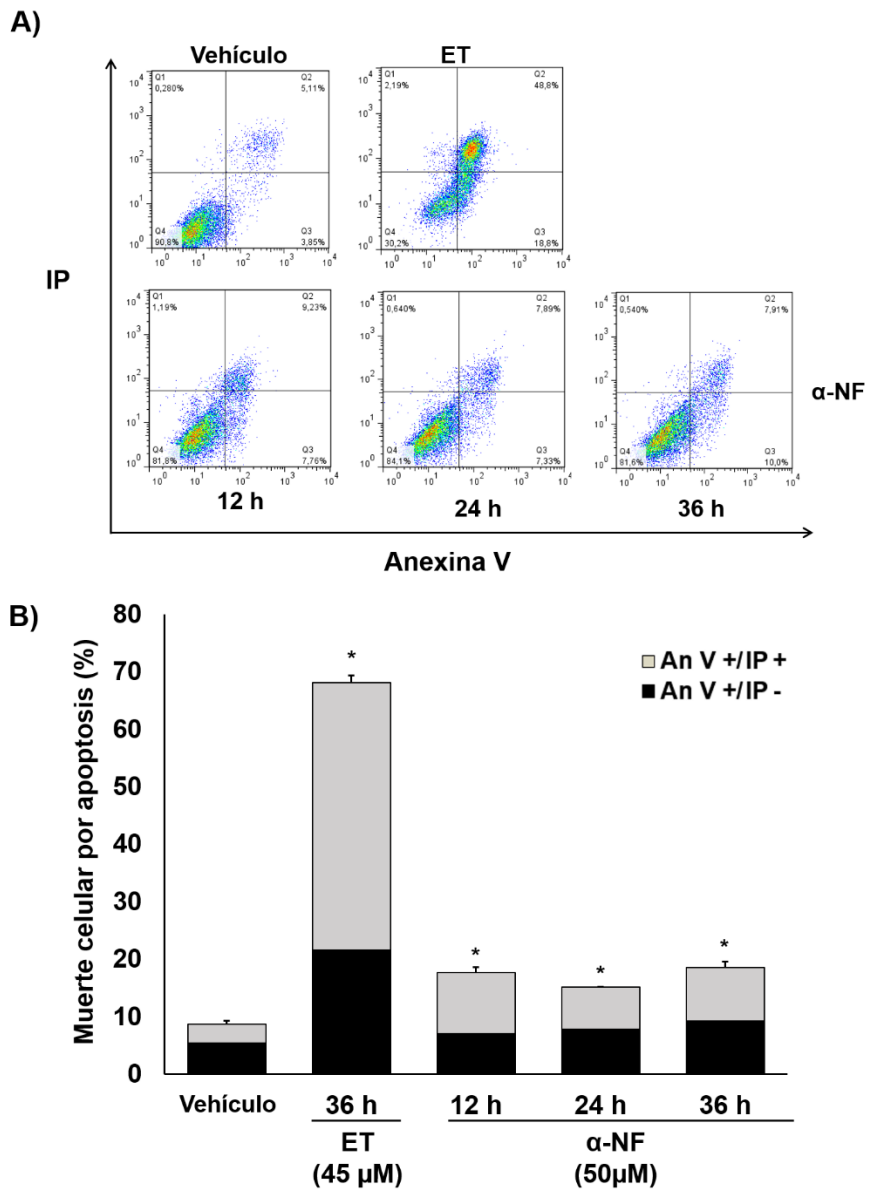


Figura 16. La α -NF incrementa los niveles de apoptosis en células HeLa. A) Cultivos dispersos de células HeLa se trataron con α -NF (50 μ M) por los tiempos indicados. Las células en proceso de apoptosis se determinaron mediante Anexina V-IP y citometría de flujo. B) Los niveles de apoptosis se expresan en porcentaje. La barra negra representa los niveles de apoptosis temprana (An V+/IP-) y la barra gris representa los niveles de apoptosis tardía (An V+/IP+). Los resultados se expresan como el promedio de tres lecturas por cada concentración probada \pm D.S. * $p < 0.01$

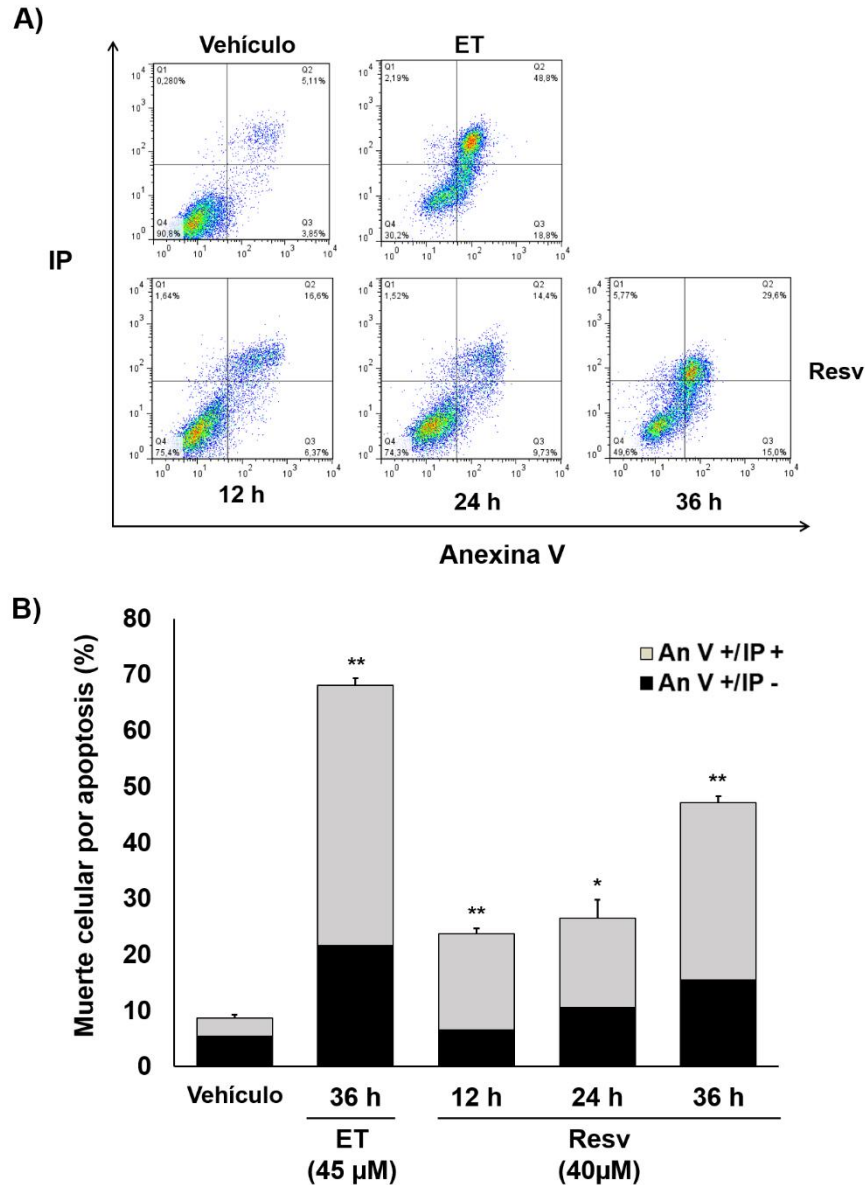


Figura 17. El Resv incrementa los niveles de apoptosis en células HeLa. A) Cultivos dispersos de células HeLa se trataron con Resv (Resv, 40 μ M) por los tiempos indicados. Las células en proceso de apoptosis se determinaron mediante Anexina V-IP y citometría de flujo. B) Los niveles de apoptosis se expresan en porcentaje. La barra negra representa los niveles de apoptosis temprana (An V+/IP-) y la barra gris representa los niveles de apoptosis tardía (An V+/IP+). Los resultados se expresan como el promedio de tres lecturas por cada concentración probada \pm D.S. * p <0.05, ** p <0.01

El supresor tumoral p53 es un factor de transcripción que juega un papel importante en el control de la proliferación celular e inducción de la apoptosis [84]. Considerando lo anterior, se evaluó si el efecto de la α -NF y del Resv sobre los niveles de apoptosis se

veía reflejado en un incremento de p53. La expresión de esta proteína se determinó mediante electroforesis y Western-blot (WB). Como se puede apreciar en la figura 18, el tratamiento con α -NF (50 μ M) incrementó significativamente los niveles de p53 a las 12 h, sin embargo, este efecto no se mantuvo a las 24 y 36 h. Por otra parte, el tratamiento con Resv (40 μ M) incrementó los niveles de p53 en función del tiempo, alcanzando una mayor inducción a las 36 h de tratamiento.

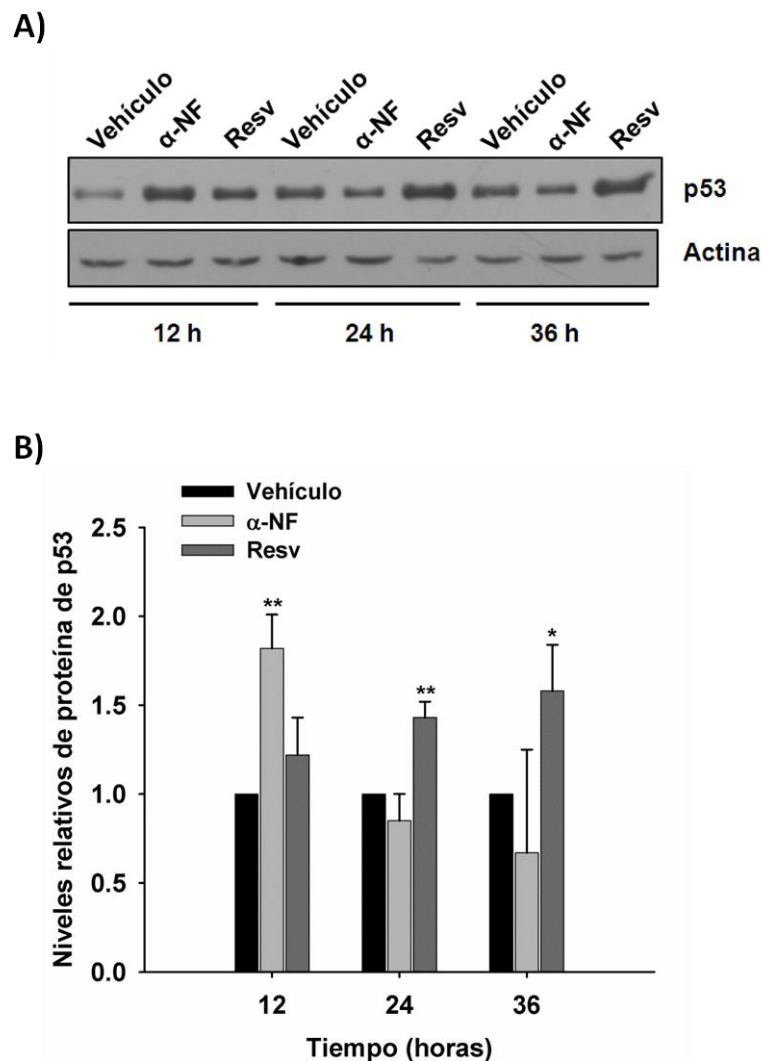


Figura 18. La α -NF y el Resv aumentan los niveles de p53 en células HeLa. A) Inmunodetección de p53 por WB en cultivos dispersos de células HeLa, tratados con α -NF (50 μ M) y Resv (40 μ M) por 12, 24 y 36 h. B) Densitometría de la inmunodetección de p53. Los datos son presentados como promedio \pm D.S. de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

6.6 Efecto de la α -NF y del Resv sobre la proliferación celular y apoptosis en células HeLa *AhR*-KO

Para investigar si los efectos de la α -NF y del Resv sobre la proliferación celular y apoptosis son dependientes del AhR, se generaron células HeLa *AhR*-KO mediante el sistema CRISPR/Cas9, a través de una delección de 84 pares de bases (pb) al exón 1 del gen *AhR* humano. Como se menciona en los métodos, realizamos transfecciones transitorias en células HeLa con dos plásmidos que codifican para las sgRNAs, más el plásmido que codifica para una proteína de fusión entre la proteína verde fluorescente (GFP) y la endonucleasa Cas9. De esta manera, se pueden detectar fácilmente células HeLa GFP positivas mediante microscopia confocal y citometría de flujo. Cuarenta y ocho h posteriores a la transfección, se evaluó la expresión de la proteína de fusión mediante microscopia confocal (Figura 19A). Al mismo tiempo, se separaron células HeLa GFP positivas mediante *cell sorting*, las cuales se sembraron en placas de 96 pozos a la densidad de una célula por pozo con el fin de obtener cultivos monoclonales. Tras 30-45 días de cultivo, la delección de 84 pb fue analizada por PCR punto final (Figura 19B). Con base en los productos de PCR obtenidos (473 y 353 pb, correspondiente al genotipo *AhR*-WT y *AhR*-KO, respectivamente), se eligieron a las células HeLa no transfectadas (*AhR*-WT), a la clona 1 (*AhR*-KO) y a la clona 27 (Mock) para experimentos subsecuentes.

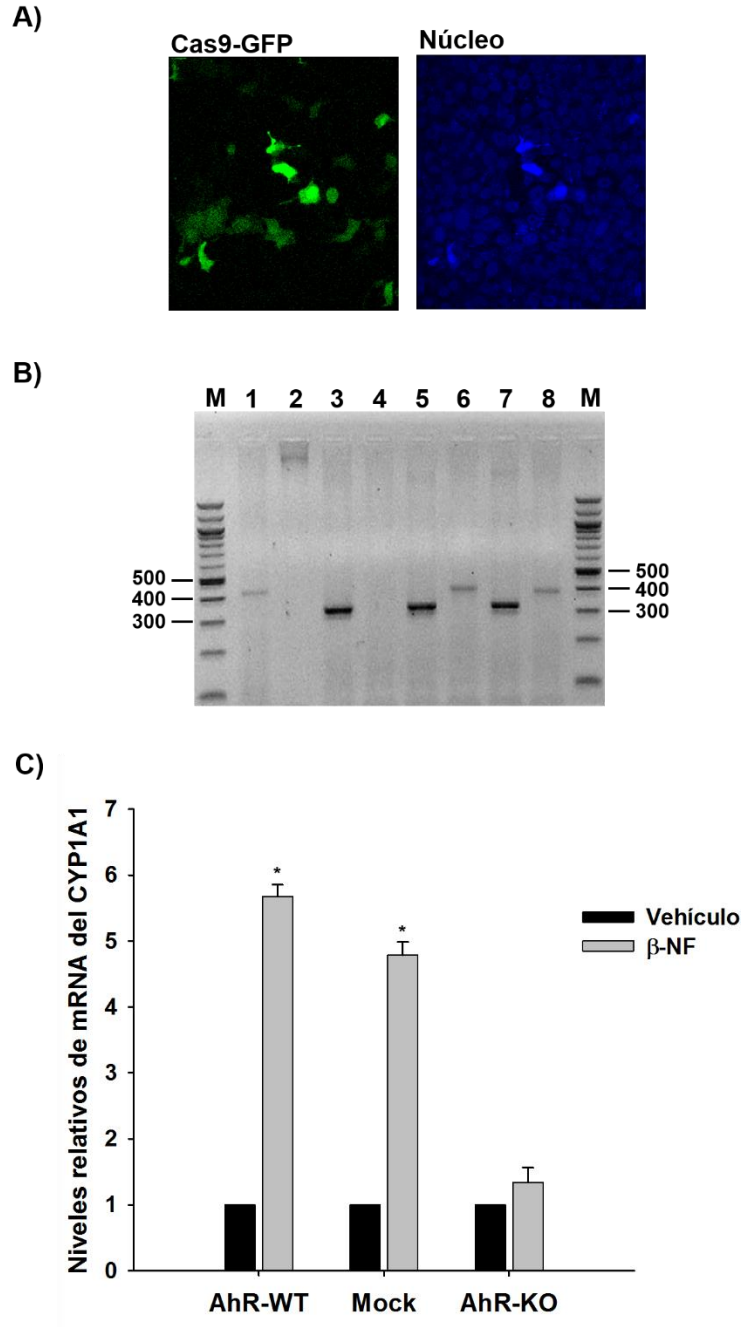


Figura 19. Análisis del genotipo y fenotipo de células HeLa transfectadas con gRNAs y pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458). A) Señal de la Cas9-GFP (verde) y de los núcleos (azul) en células HeLa 48 h después de la transfección. B) Análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR. Línea M, marcador de escalera de 100 pb; línea 1, gDNA de células HeLa no transfectadas; línea 2, gDNA de ratón; línea 3-7, gDNA de las clonas 1-5; línea 8, gDNA de la clona 27 (Mock). Los productos de PCR son 437 pb (*AhR*-WT) y 353 pb (*AhR*-KO). C) Células HeLa *AhR*-WT, Mock y *AhR*-KO (clona 1) fueron tratadas con β -NF 1 μ M por 2 h. Los niveles de mRNA del CYP1A1 fueron determinados por PCR cuantitativo. Los datos son presentados como promedio \pm D.S. de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Posteriormente se evaluó la inducción del mRNA del CYP1A1 mediante PCR cuantitativo en células HeLa *AhR*-WT, Mock y *AhR*-KO tratadas con 1 μ M de β -NF por 2 h. Como se observa en la figura 19C, el tratamiento con β -NF provocó un incremento significativo en los niveles del mRNA del CYP1A1 en células HeLa *AhR*-WT y Mock, mientras que en las células HeLa *AhR*-KO no se observó este efecto. Los resultados anteriores confirman la pérdida de la función del AhR en células HeLa *AhR*-KO.

Finalmente, se determinó el efecto de los antagonistas del AhR sobre la proliferación celular y los niveles de apoptosis en células HeLa *AhR*-WT, Mock y *AhR*-KO. Para este propósito, las células fueron tratadas con α -NF (50 μ M) y Resv (40 μ M) durante 6 días para evaluar la proliferación celular, o durante 36 h para evaluar los niveles de apoptosis. Como se muestra en la figura 20, no hay diferencia significativa en la proliferación celular ni en los niveles de apoptosis entre las células *AhR*-WT, Mock y *AhR*-KO tratadas con DMSO (vehículo). También se puede observar que ambos antagonistas del AhR bloquean la proliferación celular e incrementan la apoptosis en células HeLa *AhR*-WT y Mock como era de esperarse. Sin embargo, este mismo efecto se observó en las células HeLa *AhR*-KO. Estos datos indican que el AhR no modula la proliferación celular ni la apoptosis en células HeLa, y que los efectos de la α -NF (50 μ M) y del Resv (40 μ M) en estos procesos celulares son independientes del AhR.

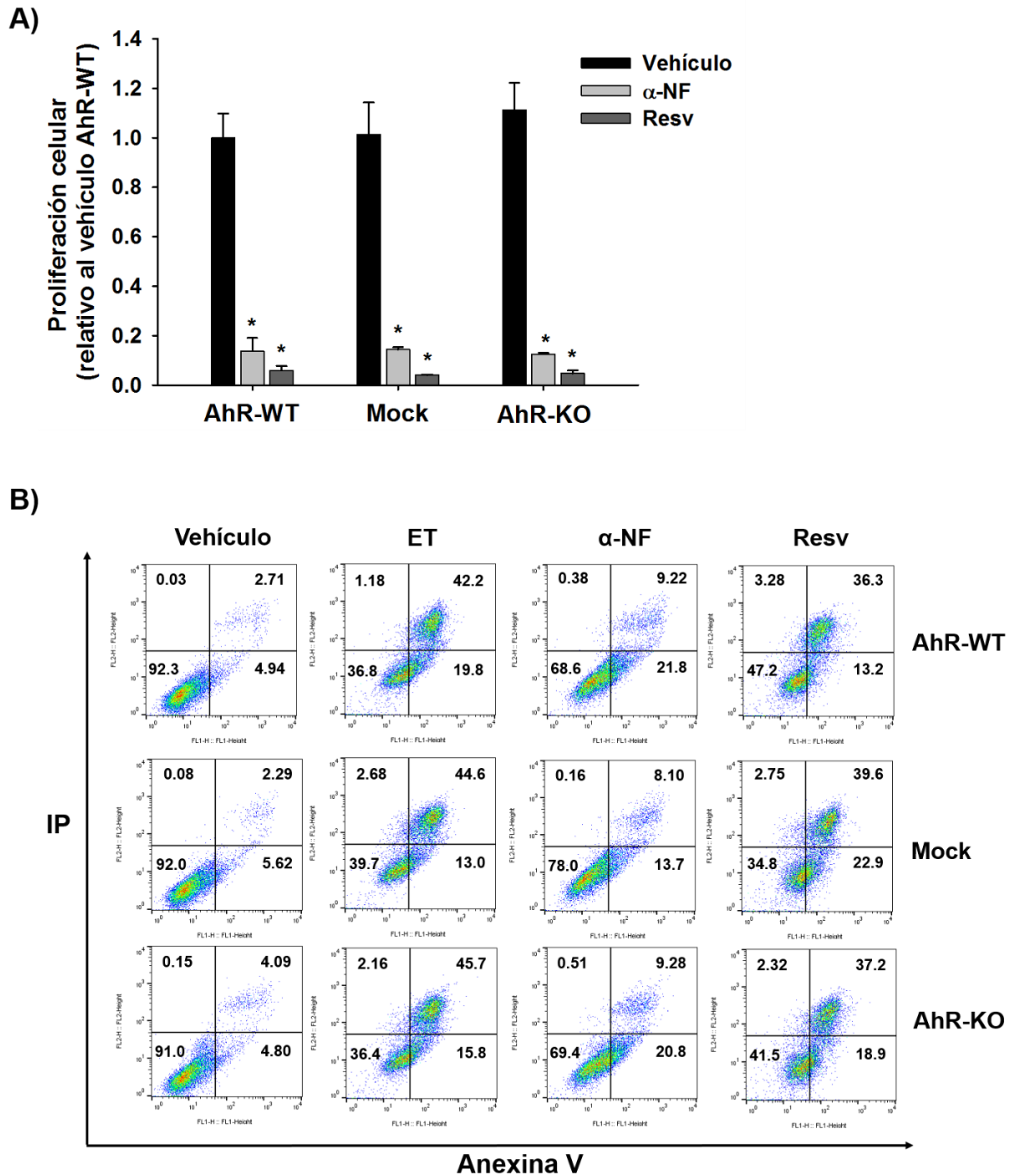


Figura 20. Efecto de la α -NF y el Resv sobre la proliferación celular y apoptosis en células HeLa *AhR*-WT, Mock y *AhR*-KO. A) Las células fueron tratadas con α -NF (50 μ M) o con Resv (40 μ M), y contadas a los 6 días de tratamiento. Los datos son presentados como promedio \pm D.S. de tres experimentos independientes. * p <0.05. B) Citogramas FACS representativos de cultivos celulares tratados con ET (45 μ M), α -NF (50 μ M) y Resv (40 μ M) por 36 h. El porcentaje de células se indica en la parte superior de cada cuadrante de los citogramas.

7. DISCUSIÓN

La intensa investigación enfocada al AhR en los últimos años ha permitido concluir que este receptor tiene un papel dual en la célula. Por una parte, el AhR es esencial para la inducción de genes responsables de la biotransformación de xenobióticos [85], así como para mediar el efecto tóxico y carcinogénico de contaminantes ambientales como el TCDD y el B[a]P [86, 87]. Por otra parte, las alteraciones observadas en el sistema inmune, hígado, corazón y ovario del ratón *Ahr*-KO apoyan la idea de que el AhR tiene un papel relevante en la fisiología celular y homeostasis de los tejidos [85, 88-95].

En particular, existen varios estudios que vinculan al AhR con la regulación de la proliferación celular y desarrollo de neoplasias. En cultivos primarios de fibroblastos y hepatocitos obtenidos de un ratón *Ahr*-KO, se observó una menor proliferación con respecto a sus controles [32, 47], lo que indica que el AhR juega un papel importante en la proliferación celular. La función del AhR en este proceso celular también se ha investigado en líneas celulares derivadas de diversos tipos de cáncer, como en células C4-2 [96], derivadas de cáncer de próstata, y en células LN-308 [55], derivadas de cáncer cerebral. En ambos tipos celulares, en ausencia de ligando exógeno, el AhR se encuentra constitutivamente activo, y su silenciamiento se ve reflejado en un decremento del crecimiento celular.

La sobre-expresión del AhR constitutivamente activo (CA-AhR, por sus siglas en inglés) ha sido estudiada en la carcinogénesis. Se ha reportado que el CA-AhR expresado en un ratón transgénico favorece el desarrollo de tumores en el estómago [97], mientras que la exposición a DEN en el mismo modelo murino favorece la hepato-carcinogénesis [98].

Por otro lado, estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que la activación del AhR por TCDD incrementa los niveles de expresión de la Ubch7, lo que resulta en un incremento en la ubiquitinación y degradación de p53, así como una disminución en los niveles de apoptosis [36]. Un estudio realizado por otro grupo de investigación

muestra que los niveles de p53 disminuyen en células del cérvix de macacos tratados con TCDD [54]. Un efecto similar se reportó en hígado de rata donde el tratamiento con TCDD bloquea la inducción de p53 provocada por el DEN [99]. En su conjunto, la evidencia anterior indica que la activación del AhR disminuye la apoptosis y favorece la carcinogénesis, mientras que la ausencia de este receptor se ve reflejada en una disminución de la proliferación celular.

En el presente trabajo, se determinó la localización sub-celular del AhR y su estado de activación, así como el efecto de antagonistas de este receptor sobre la proliferación celular y apoptosis en células HeLa. El análisis por western-blot demuestra que los niveles de expresión del AhR en células HeLa son similares a los observados en células HepG2. Vorrink y colaboradores [81], reportaron que la expresión del AhR a nivel de mRNA también es similar entre ambas líneas celulares. El hecho de que la expresión del AhR en células HeLa sea similar a la encontrada en células hepáticas es interesante ya que es en el hígado donde se ha observado una mayor cantidad de este factor de transcripción [100, 101]. Sin embargo, sería aún más importante comparar los niveles de expresión del AhR entre las células HeLa y células no transformadas del cuello uterino. Otro estudio muestra que la expresión del AhR a nivel de proteína en células HeLa es menor en comparación con línea celular Hepa 1 derivada de ratón [102]. Estos resultados son esperados ya que en roedores la expresión del AhR es mucho mayor a la reportada en humanos [103]. Con respecto a la actividad transcripcional del AhR, los resultados obtenidos por PCR cuantitativa indican que este receptor es funcional en la línea celular derivada de cáncer cervical, ya que su activación por β -NF incrementa la expresión del mRNA de su gen canónico, el *CYP1A1*.

En el presente estudio, se observó que la localización sub-celular del AhR en células HeLa, en ausencia de ligando exógeno, depende de la densidad celular. En particular, se determinó que este factor de transcripción se localiza en el citoplasma en cultivo confluyente, y predominantemente en el núcleo en cultivo disperso. La influencia de la densidad celular sobre la distribución núcleo-citoplasma también se ha reportado para otras proteínas como son APC [104] y AMPK [105], sin conocerse la razón de ello, o

HIF-1 α [106], en cuyo caso, su localización nuclear se debe aparentemente a la hipoxia generada al incrementar la densidad celular.

Dado que las fases del ciclo celular pueden determinar la distribución intracelular de proteínas como la enzima fructosa 1,6-bifosfatasa [107] y el factor de transcripción E2F-4 [108], se investigó si la distribución núcleo-citoplasma del AhR se asociaba a las diferentes fases del ciclo celular. Sin embargo, como lo muestra la figura 9, la localización del AhR no está determinada por estas. Es posible, entonces, que el contacto célula-célula determine la distribución del AhR. De hecho, Ikuta y colaboradores [56] observaron en células HaCat que la densidad celular determinaba la localización del AhR y que el uso de EGTA o medio libre de calcio provocaba una acumulación del AhR en el núcleo, sugiriendo que el contacto célula-célula determina la localización sub-celular de este factor de transcripción. En consonancia con estos estudios, se ha reportado que cuando queratinocitos humanos se cultivan en suspensión hay un incremento de la expresión del CYP1A1 y otros genes blanco del AhR [109]. De manera similar, Monk y colaboradores [110] observaron que el cultivo en suspensión de queratinocitos de rata causaba la activación transitoria del AhR, así como la inducción del CYP1A1, la cual se veía inhibida cuando al cultivo en suspensión se trataba con un antagonista del AhR como la α -NF.

Mufti y colaboradores [111, 112], reportaron un incremento en la actividad enzimática del CYP1A1 en células HepG2 y Mz-Hep-1 (derivadas de hepatocarcinoma humano), y en células Hepa-1 (derivadas de hepatocarcinoma murino) cultivadas en micro-transportadores (partículas esféricas que permiten el crecimiento en suspensión de células adherentes) en suspensión bajo agitación constante, en comparación con células cultivadas sin agitación. Este efecto no se observó en células tratadas con α -NF o en células deficientes del AhR derivadas de la línea celular Hepa-1 [111], indicando que la inducción del CYP1A1 debido a la agitación del cultivo celular es dependiente del AhR. Otro estudio muestra que la inhibición de la fosfolipasa A₂, enzima que libera al ácido araquidónico (AA) de la membrana celular, así como la inhibición del metabolismo del AA, disminuía la actividad enzimática del CYP1A1 inducida por la agitación del

cultivo celular [113]. La evidencia anterior indica que las fuerzas hidrodinámicas generadas durante la agitación del cultivo celular favorecen la activación de la fosfolipasa A₂, resultando en la liberación de AA, precursor de agonistas endógenos del AhR como la lipoxina A₄ [114] y la prostaglandina G₂ [115]. Dado que el estrés físico pudiera favorecer la activación de la fosfolipasa A₂, suena razonable sugerir que la ruptura del contacto célula-célula provoca la activación del AhR probablemente a través de ligandos endógenos sintetizados a partir del AA liberado de la membrana celular por acción de la fosfolipasa A₂.

El AhR es un factor de transcripción que necesita internalizarse en el núcleo para transactivar sus genes blancos. Sin embargo, su presencia nuclear no implica necesariamente que sea transcripcionalmente activo. Este no fue el caso para las células HeLa ya que se observó que la expresión del CYP1A1 es mayor en las células de los cultivos dispersos, donde la localización del AhR es predominantemente nuclear, en comparación con los cultivos en confluencia. De estos resultados se infiere que cuando no hay contacto célula-célula se requiere de la expresión de genes que se encuentran bajo la regulación del AhR.

Una condición para que se lleve a cabo la internalización nuclear del AhR es la unión a su ligando. Dado que las observaciones anteriores se llevaron a cabo en ausencia de un ligando exógeno, es probable que el AhR sea activado por un ligando endógeno. Recientemente, se han identificado varios ligandos endógenos de este receptor. Entre ellos, se encuentran la kinurenina y el ácido kinurénico, los cuales son productos del catabolismo, mediado por las enzimasIDO y TDO, del triptófano [55]. En particular, se ha reportado que la activación del AhR resulta en un incremento en la expresión de la IDO en la línea celular monocítica humana U937 [116], sugiriendo una regulación positiva entre los niveles de la IDO y la activación del AhR. Por otro lado, Hascitha y colaboradores [60] encontraron que los niveles de mRNA de la IDO así como los niveles de kinurenina en muestras provenientes de CCU son mayores en comparación con el tejido sano. Los datos anteriores sugieren que la localización nuclear del AhR en cultivos dispersos de células HeLa pudiera deberse a la activación de este factor de

transcripción por agonistas endógenos como la kinurenina. Sin embargo, el tratamiento con Epacadostat, un inhibidor de laIDO, no provocó un cambio en la localización nuclear del AhR en cultivos dispersos. Si bien, estos datos sugieren que la kinurenina y el ácido kinurénico no están involucrados en la activación del AhR, no es posible asegurarlo en tanto no se inhiba a la TDO la cual también participa en la síntesis de dichos agonistas endógenos. Por supuesto, el AhR pudiera ser activado por otros ligandos endógenos como metabolitos derivados de leucotrienos [117].

Las observaciones anteriores también podrían estar asociadas a modificaciones post-traduccionales (MPT) en el AhR. La NLS de este receptor está compuesta por dos segmentos de aminoácidos básicos: los segmentos RKRR y KRH, en las posiciones 13-16 y 37-39, respectivamente [41]. Se ha reportado que la sustitución de las serinas 12 y 36 por ácido aspártico, el cual mimetiza la carga negativa de la fosforilación, regula negativamente el importe nuclear del AhR activado por 3-MC [118]. Por lo tanto, es posible que fosforilaciones en la NLS del AhR influyan de manera negativa en su activación y subsecuente translocación hacia el núcleo en cultivos confluentes de células HeLa. Por otra parte, se ha encontrado que la serina 68 en la NES del AhR se fosforila después de su acumulación en el núcleo provocada por la pérdida del contacto células-célula [56].

En el presente estudio también evaluamos la activación del AhR por ligandos exógenos tanto en la condición de confluencia como dispersa. En cultivos confluentes, cuando el AhR se localiza en el citoplasma de células HeLa, el tratamiento con TCDD resulta en una inducción del mRNA del CYP1A1 con respecto a los cultivos no tratados. En contraste, en los cultivos dispersos, cuando el AhR se localiza en el núcleo, no se observa una inducción, posterior al tratamiento con TCDD, en los niveles de mRNA del CYP1A1. Lo anterior se debe, posiblemente, a que el AhR se encuentra en un máximo de activación en los cultivos dispersos y por lo tanto el TCDD ya no es capaz de sobre-inducir la expresión de mRNA del CYP1A1. Estos resultados abonan a la posibilidad de que la activación del AhR podría deberse a la presencia de un ligando endógeno.

Adicionalmente, la activación de la vía del HIF-1 α pudiera influir de manera negativa en la actividad transcripcional del AhR en células HeLa de cultivos confluentes. Sheta y colaboradores [106] reportaron que la densidad celular determina la localización subcelular de HIF-1 α en células PC3 y LNCaP (derivadas de cáncer de próstata). En estas líneas celulares, la expresión nuclear de HIF-1 α se incrementa en cultivos confluentes con respecto a los cultivos dispersos, al tiempo que su actividad transcripcional es mayor en los cultivos confluentes. Por otro lado, estudios realizados por Wang y colaboradores, mostraron que la activación de HIF-1 α por cloruro de cobalto (CoCl₂) en células HeLa resulta en una disminución del AhR nuclear y citoplásmico. Además, se ha reportado que la activación de la vía de hipoxia disminuye la transactivación del promotor del *CYP1A1*, gen canónico del AhR [119]. Lo anterior sugiere que en cultivos confluentes de células HeLa, la activación de HIF-1 α podría reducir los niveles del AhR, por lo tanto, la actividad transcripcional de este receptor se vería comprometida. Inclusive, en relación al estudio hecho por Sheeta y colaboradores [106], la inactivación de HIF-1 α en el cultivo disperso, podría favorecer la expresión basal del mRNA del *CYP1A1* debido a una mayor disponibilidad de ARNT para dimerizar con el AhR, ya que HIF-1 α , al igual que el AhR, interactúa con ARNT para unirse a sus respectivos elementos de respuesta y promover la transcripción de sus genes blanco [120].

Posteriormente, se determinó el efecto de los antagonistas del AhR, α -NF y Resv, sobre la expresión del *CYP1A1* en células HeLa. Ambos compuestos bloquearon la expresión basal del *CYP1A1*. Este resultado apoya la hipótesis de la presencia de un ligando endógeno, ya que la disminución de los niveles de *CYP1A1* debería darse en términos de una competencia entre ligandos del AhR. Como era de esperarse, ambos antagonistas bloquearon la inducción de la expresión del *CYP1A1* provocada por la β -NF, un agonista exógeno.

Estudios previos han demostrado que la delección del AhR resulta en una disminución de la proliferación celular de la mano con un incremento en los niveles de apoptosis en fibroblastos embrionarios y hepatocitos de ratón [32, 47]. Por otro lado, se ha reportado que el tratamiento con TCDD [99], ligando agonista del AhR, provoca una reducción en

los niveles de p53, aparentemente de manera dependiente del AhR. En el presente estudio se muestran datos que indican que tanto la α -NF como el Resv inhiben la proliferación celular de las células HeLa a todas las concentraciones probadas. Resultados similares se han reportado en células 5L (derivadas de hepatoma de rata) tratadas con α -NF [121] y en células HeLa tratadas con Resv [122, 123].

La disminución de la proliferación celular provocada por los tratamientos con α -NF y Resv va acompañada de un incremento en los niveles de apoptosis y de p53, siendo mayor el efecto en las células HeLa tratadas con Resv. Sin embargo y de manera inesperada, la delección del AhR en las células HeLa no afectó la inhibición de la proliferación celular ni el incremento de la apoptosis inducida por la α -NF y el Resv. Previamente, Reiners y colaboradores [121] observaron que el tratamiento con α -NF provocaba efectos citostáticos tanto en células 5L, línea celular que expresa el AhR, como en células BP8, una línea celular deficiente en AhR derivada de células 5L. Nuestros resultados junto con la evidencia anterior sugieren que la inhibición de la proliferación celular, así como la inducción de la apoptosis provocada por la α -NF y el Resv no se lleva a través de la señalización mediada por el AhR.

Se ha reportado, en células MCF10A, que análogos de la α -NF, como la flavona, flavanona y el PD98059, suprimen la actividad de la proteína cinasa activada por mitógenos (conocida en inglés como MEK), lo cual se ve reflejado en una disminución de la forma activa de su proteína blanco, la cinasa regulada por la señal extracelular (ERK1, por sus siglas en inglés) [124]. Tanto MEK como ERK1, componentes de la cascada de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPKs, por sus siglas en inglés), favorecen la proliferación y división celular [125]. Dada la similitud estructural entre los flavonoides antes mencionados y la α -NF, es posible que esta última disminuya la proliferación celular en células HeLa a través de la inhibición de MEK. Por otro lado, la α -NF disminuye la proliferación celular en células MCF-7 mediante la inhibición de la cinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés) y de la tirosina cinasa 2 rica en prolina (Pyk2, por sus siglas en inglés) [126], dos cinasas que regulan la proliferación celular y motilidad [127].

Con respecto al Resv, existen estudios en los que se observa que este polifenol inhibe la proliferación celular e incrementa la apoptosis a través de diversos blancos. Inhibe las vías de señalización que promueven la proliferación celular, como AKT [128] y PKC [129]. También se ha reportado en células MCF-7, que en el dominio extracelular de la integrina $\alpha V\beta 3$ existe un sitio de unión a Resv capaz de activar a la cinasa ERK, la cual fosforila a p53, lo que se ve reflejado en un aumento en los niveles de apoptosis [130]. Además de provocar la activación de ERK, el Resv activa a la ATM cinasa para incrementar la apoptosis a través de p53 en células derivadas de cáncer de colon [131]. En particular, en células HeLa, el Resv es capaz de inducir la expresión del gen *TP53* aparentemente a través de la activación de E2F, lo que resulta en un incremento en la apoptosis [132].

Considerando nuestros resultados, cualquiera que sea el mecanismo mediante el cual la α -NF y el Resv inhiben la proliferación celular y promueven la apoptosis, este es independiente de la presencia del AhR.

Por otro lado, las células HeLa *AhR*-KO no presentaron cambios ni en la proliferación celular ni en los niveles de apoptosis en comparación con las células HeLa control. Resultados similares fueron obtenidos por Zhang y colaboradores [133] en células MDA-MB-468 derivadas de cáncer de mama, en las cuales se inhibió la expresión del AhR mediante RNA de interferencia. Sus resultados indican que la expresión basal del AhR no afecta la proliferación de esa línea celular. Sin embargo, presentan un decremento en la fase G1 y un arresto en la fase G2/M del ciclo celular. En contraste, Abdelrahim y colaboradores [134], reportaron que el silenciamiento del AhR con RNA de interferencia en células HepG2 derivadas de hepatocarcinoma humano, bloquea la transición de la fase G1/S del ciclo celular, al tiempo que regula a la baja la expresión de ciclinas D, E y CDK2/4, sugiriendo que el AhR en este tipo celular promueve la proliferación. En este mismo reporte, también se observa que el silenciamiento del AhR en células MCF-7 promueve la transición de la fase G1/S y la proliferación celular, sugiriendo que el AhR tiene un papel inhibitorio en la proliferación de esta línea celular.

Por otro lado, en cultivos primarios de hepatocitos y fibroblastos embriónicos provenientes del ratón *Ahr*-KO, se ha observado una disminución de la proliferación celular y un incremento en los niveles de apoptosis en comparación con los controles [32, 47]. Sin embargo, estudios realizados en cultivos primarios de células madre hematopoyéticas provenientes del ratón *Ahr*-KO demostraron una mayor proliferación con respecto al control heterocigoto [135]. En conjunto, estos datos sugieren que el papel del AhR en la proliferación celular y apoptosis es altamente dependiente del contexto celular.

En resumen, la localización sub-celular y actividad transcripcional del AhR en células HeLa, en ausencia de ligando exógeno, depende de la densidad celular, un factor importante a considerar para evaluar los efectos mediados por el AhR, tanto basales como inducidos por algún ligando. Por otro lado, los antagonistas de este receptor, la α -NF y el Resv, disminuyen la proliferación celular en células HeLa al tiempo que incrementan los niveles de p53 y de apoptosis de manera independiente del AhR.

Considerando los presentes resultados y la información disponible, es importante llevar a cabo estudios que nos permitan identificar tanto al ligando endógeno como el mecanismo, dependiente del contacto célula-célula, a través del cual el AhR se internaliza al núcleo. En particular, dichos estudios deberán realizarse considerando el contexto celular con un enfoque en las posibles diferencias entre células transformadas y no transformadas.

8. CONCLUSIONES

- El AhR es funcional y se expresa en las células HeLa.
- En ausencia de ligando exógeno, la localización del AhR es predominantemente nuclear en cultivo disperso, mientras que en cultivo confluyente es predominantemente citoplásmico.
- La localización nuclear del cultivo disperso no depende de las fases del ciclo celular.
- La actividad transcripcional del AhR en ausencia de ligando exógeno, es mayor en cultivo disperso con respecto al cultivo confluyente.
- La α -NF y el Resv disminuyen la proliferación celular e incrementan los niveles de p53 y apoptosis independientemente del AhR.
- La delección del AhR no modifica la proliferación celular de células HeLa.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar si la localización sub-celular del AhR está determinada por el contacto célula-célula.
- Evaluar la actividad enzimática de la IDO, así como la concentración de la kinurenina en sobrenadantes de cultivos dispersos y confluentes.
- Investigar el efecto de la inhibición de la TDO sobre la internalización nuclear del AhR en células HeLa.
- Investigar si la importina β participa en el importe nuclear del AhR.
- Determinar si modificaciones post-traduccionales en el AhR influyen en su localización sub-celular en cultivos dispersos y confluentes.
- Determinar el mecanismo mediante el cual la α -NF y el Resv inhiben la proliferación celular e incrementan la apoptosis de células HeLa.
- Evaluar en células *HeLa* AhR-KO la capacidad de migración, invasión, angiogénesis y tumorigénesis.
- Evaluar la participación del AhR en el desarrollo del cáncer cérvico-uterino mediante la cruce de ratones transgénicos para las oncoproteínas E6 y E7 del VPH y el ratón *AhR-KO*.

10. REFERENCIAS

1. Cutts, F.T., et al., *Human papillomavirus and HPV vaccines: a review*. Bull World Health Organ, 2007. **85**(9): p. 719-26.
2. WHO. *Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer fact sheet 380*. 2016 June 2016; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>.
3. zur Hausen, H., *Papillomaviruses in human cancers*. Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(6): p. 581-7.
4. Scheffner, M., et al., *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53*. Cell, 1993. **75**(3): p. 495-505.
5. Scheffner, M., et al., *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1129-36.
6. Howley, P.M., *Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2006. **117**: p. 113-26; discussion 126-7.
7. Wang, J., et al., *Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells*. Oncogene, 2001. **20**(34): p. 4740-9.
8. Munger, K., et al., *Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein*. Oncogene, 2001. **20**(54): p. 7888-98.
9. Puga, A., C.R. Tomlinson, and Y. Xia, *Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways*. Biochem Pharmacol, 2005. **69**(2): p. 199-207.
10. Haarmann-Stemann, T. and J. Abel, *The arylhydrocarbon receptor repressor (AhRR): structure, expression, and function*. Biol Chem, 2006. **387**(9): p. 1195-9.
11. Dolwick, K.M., et al., *Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA*. Mol Pharmacol, 1993. **44**(5): p. 911-7.
12. Li, W., et al., *Ah receptor in different tissues of C57BL/6J and DBA/2J mice: use of competitive polymerase chain reaction to measure Ah-receptor mRNA expression*. Arch Biochem Biophys, 1994. **315**(2): p. 279-84.

13. Su, A., C. Wu, and M. Nanis. *BioGPS*. Available from: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=196>.
14. Su, A.I., et al., *A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6062-7.
15. Abel, J. and T. Haarmann-Stemmann, *An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology*. Biol Chem, 2010. **391**(11): p. 1235-48.
16. Fukunaga, B.N., et al., *Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor*. J Biol Chem, 1995. **270**(49): p. 29270-8.
17. 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. 107-114.
18. Denison, M.S. and S.R. Nagy, *Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. **43**: p. 309-34.
19. Gasiewicz, T.A. and G. Rucci, *Alpha-naphthoflavone acts as an antagonist of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by forming an inactive complex with the Ah receptor*. Mol Pharmacol, 1991. **40**(5): p. 607-12.
20. Merchant, M., L. Arellano, and S. Safe, *The mechanism of action of alpha-naphthoflavone as an inhibitor of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced CYP1A1 gene expression*. Arch Biochem Biophys, 1990. **281**(1): p. 84-9.
21. Wattenberg, L.W. and W.D. Loub, *Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles*. Cancer Res, 1978. **38**(5): p. 1410-3.
22. Bjeldanes, L.F., et al., *Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9543-7.
23. Mezrich, J.D., et al., *An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3190-8.
24. Bessede, A., et al., *Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway*. Nature, 2014. **511**(7508): p. 184-90.

25. Wei, Y.D., et al., *Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole*. Chem Biol Interact, 1998. **110**(1-2): p. 39-55.
26. Gillner, M., et al., *Interactions of indolo[3,2-b]carbazoles and related polycyclic aromatic hydrocarbons with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver*. Mol Pharmacol, 1993. **44**(2): p. 336-45.
27. Ciolino, H.P., et al., *Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells*. Biochem Pharmacol, 1998. **56**(2): p. 197-206.
28. Harikumar, K.B. and B.B. Aggarwal, *Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases*. Cell Cycle, 2008. **7**(8): p. 1020-35.
29. Ciolino, H.P., P.J. Daschner, and G.C. Yeh, *Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor*. Cancer Res, 1998. **58**(24): p. 5707-12.
30. Ciolino, H.P. and G.C. Yeh, *Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(4): p. 760-7.
31. Casper, R.F., et al., *Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(4): p. 784-90.
32. 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. 1056-63.
33. Fujii-Kuriyama, Y. and J. Mimura, *Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 311-7.
34. Gonzalez, F.J. and P. Fernandez-Salguero, *The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice*. Drug Metab Dispos, 1998. **26**(12): p. 1194-8.
35. Pollenz, R.S., *The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation*. Chem Biol Interact, 2002. **141**(1-2): p. 41-61.

36. Reyes-Hernandez, O.D., et al., *Ube2I3 gene expression is modulated by activation of the aryl hydrocarbon receptor: implications for p53 ubiquitination*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **80**(6): p. 932-40.
37. Fahrenkrog, B. and U. Aebi, *The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(10): p. 757-66.
38. Lange, A., et al., *Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(8): p. 5101-5.
39. Cautain, B., et al., *Components and regulation of nuclear transport processes*. *FEBS J*, 2015. **282**(3): p. 445-62.
40. Petrusis, J.R., et al., *The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(4): p. 2677-85.
41. Ikuta, T., et al., *Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(5): p. 2895-904.
42. Ikuta, T., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor*. *J Biochem*, 2000. **127**(3): p. 503-9.
43. van der Watt, P.J., et al., *The Karyopherin proteins, Crm1 and Karyopherin beta1, are overexpressed in cervical cancer and are critical for cancer cell survival and proliferation*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(8): p. 1829-40.
44. Stinchcombe, S., et al., *Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver*. *Carcinogenesis*, 1995. **16**(6): p. 1271-5.
45. Chopra, M., et al., *Inhibition of UV-C light-induced apoptosis in liver cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. *Toxicol Sci*, 2009. **111**(1): p. 49-63.
46. Worner, W. and D. Schrenk, *Influence of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes induced by 2-acetylaminofluorene, ultraviolet light, or transforming growth factor beta 1*. *Cancer Res*, 1996. **56**(6): p. 1272-8.
47. Zaher, H., et al., *The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis*. *Mol Pharmacol*, 1998. **54**(2): p. 313-21.

48. Koliopanos, A., et al., *Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer*. *Oncogene*, 2002. **21**(39): p. 6059-70.
49. Lin, P., et al., *Overexpression of aryl hydrocarbon receptor in human lung carcinomas*. *Toxicol Pathol*, 2003. **31**(1): p. 22-30.
50. Liu, Z., et al., *AhR expression is increased in hepatocellular carcinoma*. *J Mol Histol*, 2013. **44**(4): p. 455-61.
51. Rader, J.S., et al., *A unified sample preparation protocol for proteomic and genomic profiling of cervical swabs to identify biomarkers for cervical cancer screening*. *Proteomics Clin Appl*, 2008. **2**(12): p. 1658-69.
52. Buonomo, T., et al., *Involvement of aryl hydrocarbon receptor signaling in the development of small cell lung cancer induced by HPV E6/E7 oncoproteins*. *J Transl Med*, 2011. **9**: p. 2.
53. Scott, M.A., et al., *Exposure to the dioxin 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces squamous metaplasia in the endocervix of cynomolgus macaques*. *J Med Primatol*, 2001. **30**(3): p. 156-60.
54. Enan, E., et al., *Alterations in the growth factor signal transduction pathways and modulators of the cell cycle in endocervical cells from macaques exposed to TCDD*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998. **151**(2): p. 283-93.
55. Opitz, C.A., et al., *An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor*. *Nature*, 2011. **478**(7368): p. 197-203.
56. Ikuta, T., Y. Kobayashi, and K. Kawajiri, *Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(18): p. 19209-16.
57. Ball, H.J., et al., *Tryptophan-catabolizing enzymes - party of three*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 485.
58. Stone, T.W. and L.G. Darlington, *Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. **1**(8): p. 609-20.
59. Uyttenhove, C., et al., *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*. *Nat Med*, 2003. **9**(10): p. 1269-74.

60. Hascitha, J., et al., *Analysis of Kynurenine/Tryptophan ratio and expression of IDO1 and 2 mRNA in tumour tissue of cervical cancer patients*. Clin Biochem, 2016. **49**(12): p. 919-24.
61. Schwarz, E., et al., *Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells*. Nature, 1985. **314**(6006): p. 111-4.
62. Ahmed, H. and H. Ahmed, *Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization*. 2004: CRC Press. 408.
63. Golemis, E. and P.D. Adams, *Protein-protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*. 2005: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 938.
64. Froyen, E.B. and F.M. Steinberg, *Soy isoflavones increase quinone reductase in hepa-1c1c7 cells via estrogen receptor beta and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 binding to the antioxidant response element*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(9): p. 843-8.
65. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
66. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
67. Chomczynski, P., *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples*. Biotechniques, 1993. **15**(3): p. 532-4, 536-7.
68. Spiegelman, S., K.F. Watson, and D.L. Kacian, *Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(11): p. 2843-5.
69. Spiegelman, S., et al., *Characterization of the products of DNA-directed DNA polymerases in oncogenic RNA viruses*. Nature, 1970. **227**(5258): p. 563-7.
70. Dorak, M.T., *Real-time PCR*. 2007: Taylor & Francis. 333.
71. Storch, W.B., *Immunofluorescence in Clinical Immunology: A Primer and Atlas*. 2012: Birkhäuser Basel. 231.

72. de Araujo, M.E., G. Lamberti, and L.A. Huber, *Isolation of Early and Late Endosomes by Density Gradient Centrifugation*. Cold Spring Harb Protoc, 2015. **2015**(11): p. 1013-6.
73. Astrinidis, A., et al., *Cell cycle-regulated phosphorylation of hamartin, the product of the tuberous sclerosis complex 1 gene, by cyclin-dependent kinase 1/cyclin B*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51372-9.
74. Koc, A., et al., *Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools*. J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 223-30.
75. Whitcomb, E.A., et al., *Novel control of S phase of the cell cycle by ubiquitin-conjugating enzyme H7*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(1): p. 1-9.
76. Crowley, L.C., G. Chojnowski, and N.J. Waterhouse, *Measuring the DNA Content of Cells in Apoptosis and at Different Cell-Cycle Stages by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry*. Cold Spring Harb Protoc, 2016. **2016**(10): p. pdb prot087247.
77. Yue, E.W., et al., *INCB24360 (Epacadostat), a Highly Potent and Selective Indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor for Immuno-oncology*. ACS Med Chem Lett, 2017. **8**(5): p. 486-491.
78. Koopman, G., et al., *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. Blood, 1994. **84**(5): p. 1415-20.
79. Harms, D.W., et al., *Mouse Genome Editing Using the CRISPR/Cas System*. Curr Protoc Hum Genet, 2014. **83**: p. 15 7 1-27.
80. Jiang, F., et al., *Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage*. Science, 2016. **351**(6275): p. 867-71.
81. Vorrink, S.U., D.R. Hudachek, and F.E. Domann, *Epigenetic determinants of CYP1A1 induction by the aryl hydrocarbon receptor agonist 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126)*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(8): p. 13916-31.
82. Weiss, C., et al., *TCDD deregulates contact inhibition in rat liver oval cells via Ah receptor, JunD and cyclin A*. Oncogene, 2008. **27**(15): p. 2198-207.
83. Dai, W., et al., *A prototypic microfluidic platform generating stepwise concentration gradients for real-time study of cell apoptosis*. Biomicrofluidics, 2010. **4**(2).

84. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 307-10.
85. 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.
86. Fernandez-Salguero, P.M., et al., *Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 1996. **140**(1): p. 173-9.
87. Shimizu, Y., et al., *Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 779-82.
88. Benedict, J.C., et al., *Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development*. Toxicol Sci, 2000. **56**(2): p. 382-8.
89. Corchero, J., et al., *Liver portal fibrosis in dioxin receptor-null mice that overexpress the latent transforming growth factor-beta-binding protein-1*. Int J Exp Pathol, 2004. **85**(5): p. 295-302.
90. Fernandez-Salguero, P.M., et al., *Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice*. Vet Pathol, 1997. **34**(6): p. 605-14.
91. Hogaboam, J.P., A.J. Moore, and B.P. Lawrence, *The aryl hydrocarbon receptor affects distinct tissue compartments during ontogeny of the immune system*. Toxicol Sci, 2008. **102**(1): p. 160-70.
92. Lahvis, G.P., et al., *Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10442-7.
93. Laiosa, M.D., et al., *Cell proliferation arrest within intrathymic lymphocyte progenitor cells causes thymic atrophy mediated by the aryl hydrocarbon receptor*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4582-91.
94. Lund, A.K., et al., *Characterizing the role of endothelin-1 in the progression of cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor (AhR) null mice*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **212**(2): p. 127-35.
95. Vasquez, A., et al., *A role for the aryl hydrocarbon receptor in cardiac physiology and function as demonstrated by AhR knockout mice*. Cardiovasc Toxicol, 2003. **3**(2): p. 153-63.

96. Tran, C., et al., *Inhibition of constitutive aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling attenuates androgen independent signaling and growth in (C4-2) prostate cancer cells*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **85**(6): p. 753-62.
97. Andersson, P., et al., *A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(15): p. 9990-5.
98. Moennikes, O., et al., *A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice*. *Cancer Res*, 2004. **64**(14): p. 4707-10.
99. Paajarvi, G., et al., *TCDD activates Mdm2 and attenuates the p53 response to DNA damaging agents*. *Carcinogenesis*, 2005. **26**(1): p. 201-8.
100. Koch, D.C., et al., *Anti-androgen flutamide suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation via the aryl hydrocarbon receptor mediated induction of transforming growth factor-beta1*. *Oncogene*, 2015. **34**(50): p. 6092-104.
101. Masten, S.A. and K.T. Shiverick, *Characterization of the aryl hydrocarbon receptor complex in human B lymphocytes: evidence for a distinct nuclear DNA-binding form*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **336**(2): p. 297-308.
102. Perdew, G.H., B. Abbott, and L.H. Stanker, *Production and characterization of monoclonal antibodies directed against the Ah receptor*. *Hybridoma*, 1995. **14**(3): p. 279-83.
103. O'Donnell, E.F., et al., *The aryl hydrocarbon receptor mediates raloxifene-induced apoptosis in estrogen receptor-negative hepatoma and breast cancer cells*. *Cell Death Dis*, 2014. **5**: p. e1038.
104. Zhang, F., R.L. White, and K.L. Neufeld, *Cell density and phosphorylation control the subcellular localization of adenomatous polyposis coli protein*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(23): p. 8143-56.
105. Kodiha, M., et al., *Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK-->ERK1/2 pathway*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **293**(5): p. C1427-36.
106. Sheta, E.A., et al., *Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1alpha via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways*. *Oncogene*, 2001. **20**(52): p. 7624-34.
107. Mamczur, P., et al., *Cell cycle-dependent expression and subcellular localization of fructose 1,6-bisphosphatase*. *Histochem Cell Biol*, 2012. **137**(1): p. 121-36.

108. Lindeman, G.J., et al., *The subcellular localization of E2F-4 is cell-cycle dependent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5095-100.
109. Sadek, C.M. and B.L. Allen-Hoffmann, *Cytochrome P450IA1 is rapidly induced in normal human keratinocytes in the absence of xenobiotics*. J Biol Chem, 1994. **269**(23): p. 16067-74.
110. Monk, S.A., M.S. Denison, and R.H. Rice, *Transient expression of CYP1A1 in rat epithelial cells cultured in suspension*. Arch Biochem Biophys, 2001. **393**(1): p. 154-62.
111. Mufti, N.A., et al., *Possible involvement of the Ah receptor in the induction of cytochrome P-450IA1 under conditions of hydrodynamic shear in microcarrier-attached hepatoma cell lines*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **208**(1): p. 144-52.
112. Mufti, N.A. and M.L. Shuler, *Induction of cytochrome P-450IA1 activity in response to sublethal stresses in microcarrier-attached Hep G2 cells*. Biotechnol Prog, 1995. **11**(6): p. 659-63.
113. Mufti, N.A. and M.L. Shuler, *Possible role of arachidonic acid in stress-induced cytochrome P450IA1 activity*. Biotechnol Prog, 1996. **12**(6): p. 847-54.
114. Schaldach, C.M., J. Riby, and L.F. Bjeldanes, *Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor*. Biochemistry, 1999. **38**(23): p. 7594-600.
115. Seidel, S.D., et al., *Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins*. J Biochem Mol Toxicol, 2001. **15**(4): p. 187-96.
116. Vogel, C.F., et al., *Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **375**(3): p. 331-5.
117. Chiaro, C.R., et al., *Leukotriene A4 metabolites are endogenous ligands for the Ah receptor*. Biochemistry, 2008. **47**(32): p. 8445-55.
118. Ikuta, T., Y. Kobayashi, and K. Kawajiri, *Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(2): p. 545-50.
119. Chan, W.K., et al., *Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 12115-23.

120. Kewley, R.J., M.L. Whitelaw, and A. Chapman-Smith, *The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(2): p. 189-204.
121. Reiners, J.J., Jr., R. Clift, and P. Mathieu, *Suppression of cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor*. Carcinogenesis, 1999. **20**(8): p. 1561-6.
122. Sexton, E., et al., *Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 45.
123. Zoberi, I., et al., *Radiosensitizing and anti-proliferative effects of resveratrol in two human cervical tumor cell lines*. Cancer Lett, 2002. **175**(2): p. 165-73.
124. Reiners, J.J., Jr., et al., *PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(3): p. 438-45.
125. Maik-Rachline, G. and R. Seger, *The ERK cascade inhibitors: Towards overcoming resistance*. Drug Resist Updat, 2016. **25**: p. 1-12.
126. Datta, A., et al., *Selective targeting of FAK-Pyk2 axis by alpha-naphthoflavone abrogates doxorubicin resistance in breast cancer cells*. Cancer Lett, 2015. **362**(1): p. 25-35.
127. Hall, J.E., W. Fu, and M.D. Schaller, *Focal adhesion kinase: exploring Fak structure to gain insight into function*. Int Rev Cell Mol Biol, 2011. **288**: p. 185-225.
128. Bhardwaj, A., et al., *Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells*. Blood, 2007. **109**(6): p. 2293-302.
129. Atten, M.J., et al., *Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells*. Invest New Drugs, 2005. **23**(2): p. 111-9.
130. Lin, H.Y., et al., *Integrin alphaVbeta3 contains a receptor site for resveratrol*. FASEB J, 2006. **20**(10): p. 1742-4.
131. Demoulin, B., et al., *Resveratrol induces DNA damage in colon cancer cells by poisoning topoisomerase II and activates the ATM kinase to trigger p53-dependent apoptosis*. Toxicol In Vitro, 2015. **29**(5): p. 1156-65.

132. Uchiyama, F., et al., *Characterization of the 5'-flanking region of the human TP53 gene and its response to the natural compound, Resveratrol*. J Biochem, 2016. **159**(4): p. 437-47.
133. Zhang, S., et al., *The aryl hydrocarbon receptor as a target for estrogen receptor-negative breast cancer chemotherapy*. Endocr Relat Cancer, 2009. **16**(3): p. 835-44.
134. Abdelrahim, M., R. Smith, 3rd, and S. Safe, *Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(6): p. 1373-81.
135. Singh, K.P., et al., *Aryl hydrocarbon receptor-null allele mice have hematopoietic stem/progenitor cells with abnormal characteristics and functions*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(5): p. 769-84.

11. APÉNDICE I

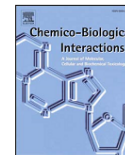
Artículo publicado

Flores-Pérez A. and Elizondo G. (2017). Apoptosis induction and inhibition of HeLa cell proliferation by alpha-naphthoflavone and Resv are aryl hydrocarbon receptor-independent. *Chemico-Biological Interactions*. 281:98-105.



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

Apoptosis induction and inhibition of HeLa cell proliferation by alpha-naphthoflavone and resveratrol are aryl hydrocarbon receptor-independent



Alegre Flores-Pérez, Guillermo Elizondo*

Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, Av. IPN 2508, C.P. 07360, México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Aryl hydrocarbon receptor
 α -Naphthoflavone
Resveratrol
HeLa cells
Apoptosis

ABSTRACT

Human papilloma viruses 16 and 18 express E6 and E7 oncoproteins. E6 activates and redirects E6-associated protein (E6AP), an E3 ubiquitin ligase. E6AP interacts with Ube2L3, an E2 ubiquitin conjugating enzyme protein (also known as UbcH7), to promote p53 ubiquitination and degradation by the 26S proteasome. Therefore, blocking E6-mediated p53 degradation might be an alternative treatment for cervical cancer. In addition, activation of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) induces Ube2L3 expression, resulting in p53 ubiquitination and degradation. The aim of the present study was to determine whether inhibition of AHR in HeLa cells resulted in an increase in p53 and apoptosis along with a decrease in cell proliferation. The results demonstrate that two AHR antagonists, α -naphthoflavone (α -NF) and resveratrol, decreased cell proliferation, arrested cells in the gap 1/synthesis (G1/S) phases, and increased p53 levels and apoptosis. However, knocking out the *Ahr* gene did not abrogate the effects of α -NF and resveratrol. Moreover, *Ahr*-null cells presented similar cell proliferation rates and apoptosis levels when compared to control HeLa cells. Taken together, the results indicate that α -NF's and resveratrol's cytostatic and cytotoxic actions, respectively, occur through an AHR-independent mechanism, and that AHR is not required for HeLa cell proliferation.

1. Introduction

Cervical cancer is the second most common cancer among women globally, and it is the fourth leading cause of death in this population. Human papilloma virus 16 and 18 (HPV16 and HPV18) infections are responsible for 55% and 15% of cervical cancer cases, respectively [1]. Both HPV genomes encode the *E6* and *E7* genes, which are involved in the inactivation of host tumor suppressor genes and allow for oncogenic progression. In particular, the E6 protein activates and redirects E6-associated protein (E6AP), an E3 ubiquitin ligase that interacts with Ube2L3, to promote p53 ubiquitination and degradation by the 26S proteasome [2]. Therefore, blocking E6-mediated p53 degradation might be an alternative treatment for cervical cancer.

The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-activated receptor that is a member of the basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim (bHLH-PAS) transcription factor family. Environmental contaminants, such as halogenated aromatic hydrocarbons (HAHs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), represent the most characterized AHR ligands. Upon ligand binding, the AHR translocates from the cytoplasm to the nucleus, and it upregulates the expression of a battery of genes, such as xenobiotic-metabolizing enzymes [3]. Although the AHR may function as part of an adaptive chemical response, studies have suggested that

this transcription factor could have important functions in several cell processes, including cell proliferation and apoptosis [4,5]. Activation of AHR was shown to inhibit apoptosis triggered by ultraviolet light [6]. In addition, an HAH called 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) decreased the p53 response to DNA damage by increasing Mdm2 protein levels [7]. Mdm2 is an E3 ubiquitin ligase involved in p53 ubiquitination [7]. Recently, we showed that AHR activation induces Ube2L3 (also known as UbcH7) expression, which results in an increase in p53 ubiquitination and degradation and a decrease in apoptosis [8]. Another study showed that activation of AHR by TCDD counteracts p53 activation by increasing anterior gradient-2 (AGR2) expression [9].

The above data suggest that activation of the AHR inhibits cell apoptosis through p53 inactivation and degradation. Therefore, the goal of the present study was to determine whether two AHR antagonists, namely, resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene), a polyphenol, and α -naphthoflavone (α -NF), a PAH, would increase the p53 half-life and apoptosis and decrease cell proliferation in HeLa cells. In addition, we evaluated whether AHR mediated these effects.

* Corresponding author. Departamento de Biología Celular, Cinvestav, Apto. 2508, México D.F., Mexico.
E-mail address: gazuela@cinvestav.mx (G. Elizondo).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.029>

Received 18 October 2017; Received in revised form 30 November 2017; Accepted 18 December 2017

Available online 20 December 2017

0009-2797/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

TCDD was purchased from AccuStandard (New Haven, CT, USA). β -naphthoflavone (β -NF), α -NF, resveratrol, etoposide (ET), and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). DMSO was used as a vehicle ($< 0.1\%$, v/v).

2.2. Cell culture

HeLa cells were kindly provided by Dr. Juan Pedro Luna Arias (CINVESTAV-IPN, México), and HepG2 cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Both cell lines were grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium-high glucose (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT, USA) and 1% antibiotic/antimycotic (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C in a humidified incubator with a 5% CO₂ atmosphere.

2.3. Western blot analysis

Cell protein extraction was performed as described previously [10]. Briefly, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and solubilized in lysis buffer containing 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 0.5 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10% (v/v) glycerol, 1% Triton X-100, and minicomplete protease inhibitor cocktail. The lysates were incubated on ice and vortexed every 10 min for 1 h, followed by centrifugation at 13,000 revolutions per minute (rpm) for 10 min at 4 °C. Protein concentrations were determined using the Bradford reaction (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). From each sample, 40 μ g of protein were loaded on a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. Following electrophoresis, the proteins were transferred onto a 0.45 μ m nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using a Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell device (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at a constant voltage of 20 V for 1 h in transfer buffer (48 mM Tris-HCl, 39 mM glycine, pH 8.3; 20% methanol). The membrane was blocked for 1 h at room temperature (RT) with 5% non-fat milk in Tris-Buffered Saline-Tween (TBS-T), and subsequently incubated with anti-p53 (1:1000; DO-1, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-AHR (1:1000; RPT1, Abcam, Cambridge, MA, USA), or goat polyclonal anti-actin (1:1000; I-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) antibodies. After binding with appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies, the immunoreactive proteins were detected using a chemiluminescence western blotting detection kit (Millipore, Billerica, MA, USA). The integrated optical density of the bands was quantified by densitometry using ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, US).

2.4. Confocal microscopy

HeLa cells (2×10^5) were seeded in 35 mm dishes with glass coverslips. After 24 h, the cells were treated with 10 nM TCDD for 2 h and then fixed with 3.5% paraformaldehyde in PBS for 2 h at 4 °C. The fixed cells were permeabilized with 0.05% Triton X-100 for 5 min, and blocked for 1 h with 5% bovine serum albumin (BSA) at RT. Then, cells were incubated for 2 h with anti-AHR antibodies (1:200; RPT1, Abcam, Cambridge, MA, USA) in 5% BSA. The primary antibody was detected with Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse antibodies (1:200; A-11001, Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, USA). F-actin was stained with rhodamine-phalloidin for 15 min at RT and then mounted with Vectashield mounting medium and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). For Cas9-green fluorescent protein (Cas9-GFP) detection, cells were cultured in

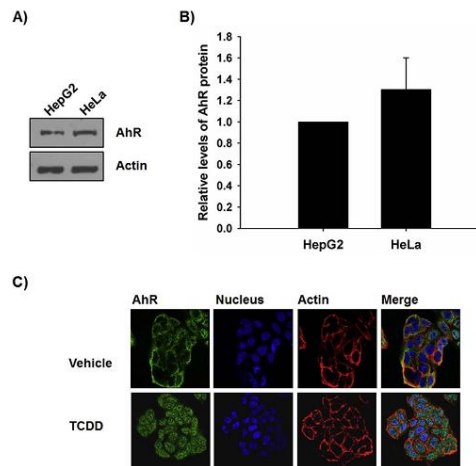


Fig. 1. AHR is expressed in HeLa cells and translocates to the nucleus after TCDD treatment. (A) Western blot of AHR in cell lysates from HepG2 and HeLa cells. β -actin was used as a loading control. (B) Densitometry analysis of AHR protein levels. Data are presented as the mean \pm S.D. of three different experiments. (C) Representative confocal microscopy images of AHR in HeLa cells treated with vehicle (DMSO) or TCDD (10 nM) for 2 h. AHR, DAPI, and actin microfilaments are visualized as green, blue, and red, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

35 mm dishes, fixed, permeabilized, blocked, and mounted as described above. Images were captured with a Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.5. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis

Total RNA was isolated from cultured HeLa cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The yield and purity of the RNA were estimated spectrophotometrically using the A_{260}/A_{280} ratio. Complementary DNA (cDNA) for the qPCR assay was prepared from 3 μ g of total RNA using random primers and SuperScript First-Strand Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The real-time polymerase reaction (PCR) was performed in a StepOne Real-Time PCR System with TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) according to the manufacturer's protocol. Relative gene expression was quantified by the comparative threshold cycle (C_T) method. The probes used for CYP1A1, Ube2l3, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were obtained from Applied Biosystems (Branchburg, NJ, USA) with the identification numbers Hs02382618_s1, Hs00748530_s1, and 4326317E, respectively.

2.6. Cell proliferation assay

HeLa cells were seeded in a six-well plate at a density of 1×10^4 cells/well and treated with α -NF or resveratrol. Trypan blue was used to exclude nonviable cells. Cell number was determined every 24 h for six consecutive days using a hemocytometer. To determine the IC₅₀ (concentration required to cause a 50% reduction in cell proliferation), HeLa cells were counted after treatment with α -NF (50 μ M) or resveratrol (80 μ M) for six days. The IC₅₀ was calculated using the dynamic curve fitting algorithm in SigmaPlot 11.0 software (Systat Software Inc., CA, USA).

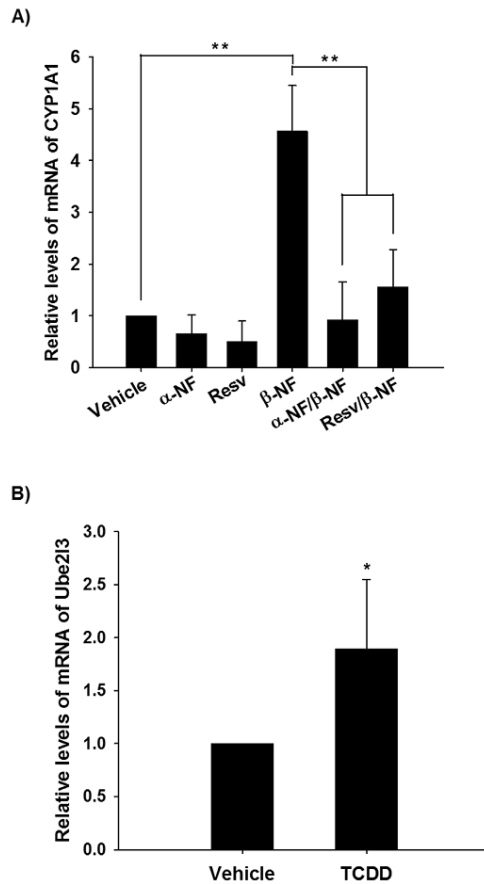


Fig. 2. Effects of α -NF and resveratrol on AHR-mediated CYP1A1 and Ube2l3 mRNA induction. (A) HeLa cells were treated with vehicle (DMSO), α -NF (50 μ M), resveratrol (40 μ M), β -NF (1 μ M), or co-treated with α -NF (50 μ M)/ β -NF (1 μ M) or resveratrol (40 μ M)/ β -NF (1 μ M) for 2 h. (B) HeLa cells were treated with vehicle (DMSO) or TCDD (10 nM) for 2 h. CYP1A1 and Ube2l3 mRNA levels were determined by qPCR and normalized with GAPDH. Data are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * p = .07, ** p < .05.

2.7. Cell cycle analysis

The cell cycle was analyzed using propidium iodide (PI) staining and flow cytometry. Briefly, HeLa cells were seeded in 60 mm culture dishes and cultured for 24 h. Then, the cells were treated with α -NF (50 μ M) or resveratrol (40 μ M). After treatment, the cells were harvested with trypsin-EDTA and fixed with 70% cold ethanol for 1 h at 4 °C. The ethanol was then removed, and the cells were resuspended in PBS containing PI (20 μ g/mL) and RNase A (73 μ g/mL). After 30 min at RT in the dark, the DNA content was determined with a FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, USA). Cell cycle distribution was calculated from 20,000 gated events with ModFit LT software (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

2.8. Apoptosis assay

Cell death by apoptosis was assayed with an Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN, USA) according to the

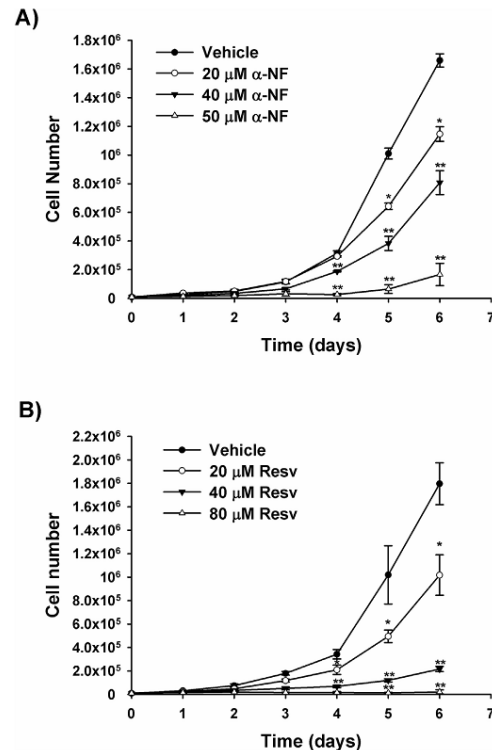


Fig. 3. Effects of α -NF and resveratrol on HeLa cell proliferation. Cells were treated with (A) α -NF or (B) resveratrol at the indicated concentrations and times. The number of cells was determined every 24 h. Data are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * p < .05, ** p < .01.

manufacturer's instructions. Briefly, HeLa cells were seeded in 60 mm culture dishes. After 24 h, cells were treated with ET (45 μ M), α -NF (50 μ M), or resveratrol (40 μ M) for 12, 24, and 36 h. Cells (1×10^6) were then collected with 0.02% EDTA-PBS buffer and centrifuged at 1500 rpm for 5 min. The resulting pellet was washed once with PBS and resuspended in 100 μ L of staining buffer containing 0.4 μ L Annexin-V-Fluorescein (An V) and 2 μ L PI. Samples were incubated for 15 min at RT in the dark and then analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, USA).

2.9. CRISPR/Cas9 AHR knockout generation

Plasmids encoding gRNA 93 and gRNA 96 targeting human *Ahr* exon 1 were kindly provided by Dr. Fernández-Salguero (Universidad de Extremadura, Spain). Both gRNA plasmids and the pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmid (Addgene, Cambridge Massachusetts, USA, plasmid #48138) were cotransfected in HeLa cells using Turbofectin 8.0 transfection reagent (OriGen, Rockville, USA) according to the manufacturer's protocol. Cas9-GFP expression was evaluated 48 h after transfection by confocal microscopy as described above. Cells were sorted to isolate the green fluorescent protein (GFP)-positive population using fluorescence-activated cell sorting (FACS). The sorted cells were plated in 96-well culture plates at single cell density. After 30–45 days of growth, cell clones were genotyped by PCR. DNA was purified, and PCR amplification was performed as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 67.9 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 2.5 min. A

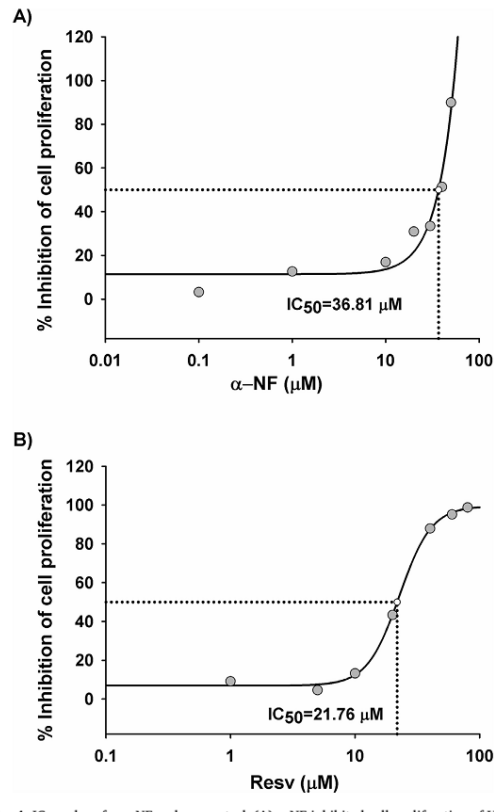


Fig. 4. IC_{50} values for α -NF and resveratrol. (A) α -NF inhibited cell proliferation of HeLa cells with an IC_{50} of 36.81 μ M. (B) Resveratrol inhibited cell proliferation of HeLa cells with an IC_{50} of 21.76 μ M. IC_{50} values were calculated using the data from day 6.

final extension cycle at 72 °C for 10 min was added to the end of the program. The oligonucleotides used for PCR amplification were: forward 5'-ATCTGGCGGGGGCGGCCGGTG-3' and reverse 5'-AGGTGC CGTCTACACCGCGGAG-3'.

2.10. Statistical analysis

The results are presented as the mean values \pm the standard deviation (S.D.). The statistical significance of the data was evaluated using the Student's *t*-test. In all cases, the differences between groups

were considered to be statistically significant when the *p*-value was ≤ 0.05 .

3. Results

The AHR is constitutively expressed in the liver, kidney, lung, heart, thymus, placenta, and other organs [11,12]. It is also expressed in several human cell lines, such as HepG2, MCF-7, and HeLa cells [13] [14]. To compare the AHR expression levels in HeLa cells to those in HepG2 cells, we analyzed the presence of this receptor with western blotting. As shown in Fig. 1, AHR protein levels in HeLa cells are similar to those in HepG2 cells. We then examined whether the activation of AHR modifies its subcellular localization. For this purpose, HeLa cells were treated with 10 nM TCDD for 2 h, and then AHR localization was evaluated by confocal microscopy. AHRs are located predominantly in the cytoplasm of untreated HeLa cells although they can also be observed in the nucleus and apparently associated to cell membrane. In contrast, HeLa cells treated with TCDD present most of the AHR signal in the nucleus (Fig. 1C), indicating that activation of the AHR promotes its translocation from the cytoplasm to the nucleus.

As the AHR is a ligand-dependent transcription factor, we studied its functionality by determining the mRNA levels of CYP1A1, one of its target genes. Treatment with the AHR agonist β -NF produced a 4.5-fold increase in CYP1A1 mRNA levels when compared with controls (Fig. 2A, column 4). To evaluate whether α -NF and resveratrol inhibit AHR-mediated CYP1A1 induction, HeLa cells were cotreated with α -NF/ β -NF or resveratrol/ β -NF and then CYP1A1 mRNA levels were determined. As expected, α -NF and resveratrol decreased the CYP1A1 mRNA levels compared with β -NF alone (Fig. 2A, columns 5 and 6). These results indicate that AHR is functional in HeLa cells and that α -NF and resveratrol decrease the induction in the expression of CYP1A1 caused by the β -NF treatment. We also evaluated whether AHR activation induces Ube2I3 expression in HeLa cells. As Fig. 2B shows, a marginal induction ($p = .07$) in Ube2I3 mRNA was observed after treating cells with TCDD.

As the absence or activation of AHR can alter cell proliferation [4,15] [16], we evaluated the effect of AHR antagonists on HeLa cell growth. Cells were treated with α -NF or resveratrol at the indicated concentrations, and the number of cells was determined each day for six days. As shown in Fig. 3, cell proliferation was significantly decreased in a dose-dependent manner after treatment with both compounds. After five days, proliferation was significantly inhibited at all concentrations tested for α -NF and resveratrol. The IC_{50} values for both AHR antagonists, α -NF and resveratrol, were in the micromolar range (Fig. 4). However, resveratrol had a larger effect in inhibiting cell proliferation ($IC_{50} = 21.76 \mu$ M) than α -NF ($IC_{50} = 36.81 \mu$ M).

To examine the effect of AHR antagonists on the distribution of cell cycle phases, HeLa cells were treated with 50 μ M α -NF or 40 μ M resveratrol and flow cytometry analysis was carried out. Treatment with α -NF for 4, 8, 12, 16, and 20 h did not modify the distribution of cell

Table 1
Distribution of cell cycle phases in control and α -NF (50 μ M) treated HeLa cells.

Time (hours)	Cell cycle distribution					
	G1		S		G2/M	
	Vehicle	α -NF	Vehicle	α -NF	Vehicle	α -NF
0	50.2 \pm 0.7	50.2 \pm 0.7	39.5 \pm 1.2	39.5 \pm 1.2	10.7 \pm 0.4	10.7 \pm 0.4
24	55.4 \pm 0.7	53.4 \pm 0.9	32.8 \pm 0.7	31.9 \pm 0.2	11.3 \pm 0.4	14.5 \pm 0.8
48	54.0 \pm 1.9	44.1 \pm 2.2**	32.6 \pm 1.6	43.2 \pm 1.5**	13.2 \pm 0.3	12.6 \pm 0.8
72	56.1 \pm 1.5	47.4 \pm 1.1**	29.7 \pm 1.1	34.6 \pm 1.9*	14.1 \pm 0.4	17.7 \pm 0.9*
96	59.2 \pm 0.1	51.9 \pm 1.0**	28.7 \pm 0.4	33.1 \pm 1.4*	11.9 \pm 0.3	14.7 \pm 0.7*
120	62.5 \pm 0.2	48.8 \pm 0.7**	23.2 \pm 0.3	38.6 \pm 2.3**	14.5 \pm 0.1	12.4 \pm 1.6
144	65.2 \pm 0.2	56.7 \pm 0.8**	23.6 \pm 0.0	31.0 \pm 1.8*	11.1 \pm 0.2	12.0 \pm 2.1

Data are presented as mean \pm SD from three independent experiments. * $p < .05$, ** $p < .01$.

Table 2
Distribution of cell cycle phases in control and resveratrol (40 μM) treated HeLa cells.

Time (hours)	Cell cycle distribution					
	G1		S	G2/M		
	Vehicle	Resveratrol	Vehicle	Resveratrol	Vehicle	
0	51.2 ± 0.4	51.2 ± 0.4	29.0 ± 0.9	29.0 ± 0.9	20.0 ± 0.5	20.0 ± 0.5
4	55.2 ± 1.4	66.1 ± 0.4**	23.9 ± 1.6	26.7 ± 0.0*	20.8 ± 0.5	7.0 ± 0.4**
8	58.7 ± 2.6	68.6 ± 0.3**	26.4 ± 2.2	26.2 ± 0.4	14.8 ± 0.6	5.1 ± 0.7**
12	55.7 ± 0.1	62.1 ± 0.9**	32.9 ± 0.5	36.7 ± 1.7*	7.6 ± 6.6	1.1 ± 1.0
16	53.6 ± 1.4	56.9 ± 5.2	32.1 ± 0.8	43.0 ± 5.1*	14.2 ± 1.5	0.0 ± 0.1**
20	53.7 ± 0.4	25.6 ± 2.6**	27.9 ± 0.2	74.4 ± 2.6**	18.2 ± 0.7	0.0 ± 0.0**

Data are presented as mean ± SD from three independent experiments. *p < .05, **p < .01.

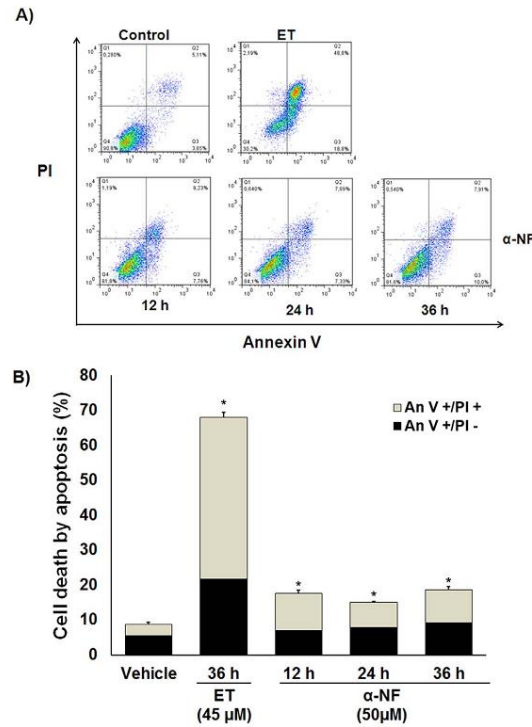


Fig. 5. α-NF treatment induces apoptosis in HeLa cells. (A) Representative FACS histograms of cell cultures treated with α-NF (50 μM) at the indicated times. Cell cultures treated with etoposide (ET, 45 μM for 36 h) were used as positive controls. (B) Percentages of cells in early apoptosis (An V⁺ PI⁻) and late apoptosis (An V⁺ PI⁺). Data are presented as the mean ± S.D. of three independent experiments. *p < .01.

cycle phases (data not shown). After 48 h, there was a 10% decrease in gap 1 (G1) phase cells accompanied by an 11% increase in synthesis (S) phase cells in comparison to controls (Table 1). In contrast, resveratrol arrested cells in the G1 phase from 4 h to 16 h. After 20 h, 74% of the cells were present in the S phase compared to 28% of control cells. The delay in the S phase was accompanied by a decrease in cells in the G1 and gap 2/mitosis (G2/M) phases (Table 2). Thus, these results suggest that α-NF and resveratrol might inhibit cell proliferation by arresting cells in the G1/S phases.

Subsequently, we examined the effect of α-NF and resveratrol on apoptosis by using Annexin V/PI staining and flow cytometry. As shown in Fig. 5, α-NF induced a mild but significant apoptosis rate in HeLa

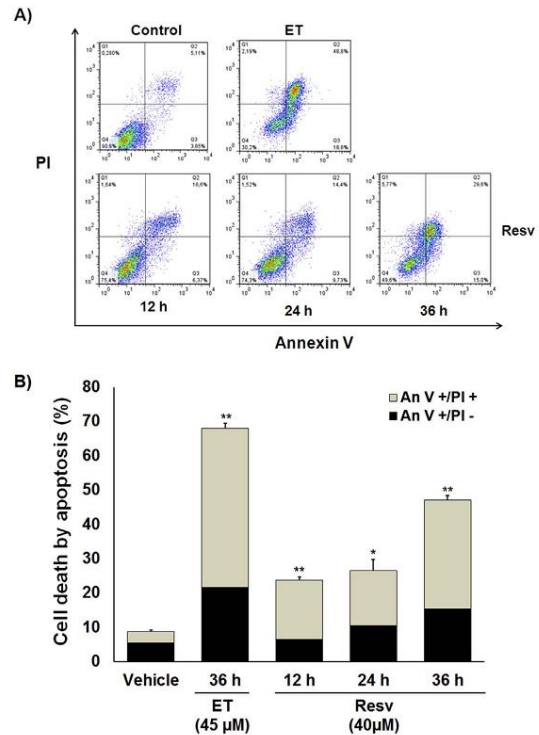


Fig. 6. Resveratrol treatment induces apoptosis in HeLa cells. (A) Representative FACS histograms of cell cultures treated with resveratrol (40 μM) at the indicated times. Cell cultures treated with etoposide (ET, 45 μM for 36 h) were used as positive controls. (B) Percentages of cells in early apoptosis (An V⁺ PI⁻) and late apoptosis (An V⁺ PI⁺). Data are presented as the mean ± S.D. of three independent experiments. *p < .05, **p < .01.

cells at all time points tested compared to the controls. In contrast, treatment with resveratrol progressively increased both early and late apoptosis in a time-dependent manner (Fig. 6). After 36 h of treatment, the percentage of apoptotic cells reached 46%. The above results suggest that inhibition of cell proliferation by α-NF and resveratrol results from an increase in the apoptosis rate.

Given that treatment of HeLa cells with α-NF and resveratrol promoted an increase in cell death by apoptosis, we determined the expression level of p53 by western blotting. As shown in Fig. 7, both AHR antagonists increased p53 protein levels. Treatment with α-NF caused a

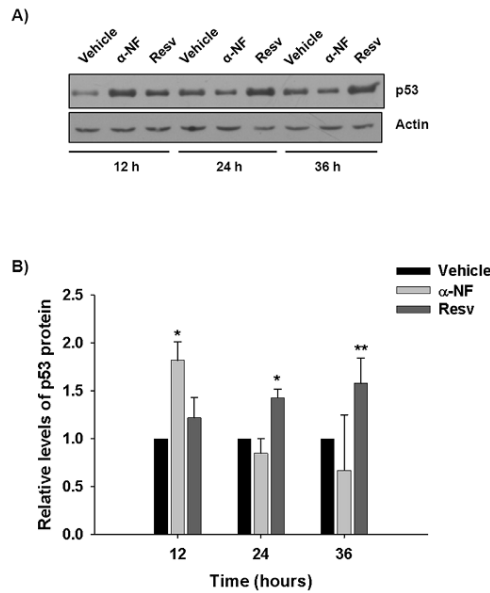


Fig. 7. AHR antagonists increase p53 levels in HeLa cells. (A) Cell cultures were treated with α -NF (50 μ M) or resveratrol (40 μ M) at the indicated times, and p53 levels were determined by western blotting. β -actin was used as a loading control. A representative blot is shown. (B) Densitometry analysis of p53 protein levels. Data are presented as the mean \pm S.D. of three different experiments. * $p < .05$, ** $p < .01$.

significant increase in p53 levels only at 12 h. In contrast, resveratrol increased p53 levels at 12, 24, and 36 h in a time-dependent manner. Thus, the present data indicate that α -NF and resveratrol inhibit cell proliferation by accumulating cells in the G1/S phases and by increasing cell apoptosis, which is probably mediated by p53 induction.

To investigate whether the effects of α -NF and resveratrol on cell proliferation and apoptosis were mediated by AHR, *Ahr*-KO HeLa cell lines were generated using the CRISPR/Cas9 system. Cas9-GFP expression in HeLa cells was observed 48 h after transfection (Fig. 8A). The genetic deletion of cell clones was analyzed by PCR genotyping. Based on the PCR products (437 base pairs (bp) for *Ahr*-WT and 353 bp for *Ahr*-KO, Fig. 8B), we chose nontransfected HeLa cells (*Ahr*-WT) and clone 1 (*Ahr*-KO) for subsequent experiments. To test the functionality of AHR, the mRNA levels of CYP1A1 in *Ahr*-WT cells were determined (clone 1). As presented in Fig. 8C, treatment with β -NF produced a five-fold increase in CYP1A1 mRNA levels in *Ahr*-WT cells in comparison to control cells. In contrast, β -NF treatment failed to induce changes in CYP1A1 levels in the *Ahr*-KO cells (clone 1). These results demonstrate the loss of AHR function in *Ahr*-KO HeLa cells.

Once the *Ahr*-KO HeLa cells were characterized, cell proliferation and apoptosis levels were determined. In these experiments, cells were treated with α -NF or resveratrol to evaluate cell proliferation (Fig. 9A) and apoptosis (Fig. 9B). Surprisingly, no differences in cell proliferation or apoptosis were observed between HeLa and *Ahr*-KO cells after α -NF or resveratrol treatments. These data indicate that the effects of α -NF and resveratrol on these cellular processes are AHR-independent.

4. Discussion

The AHR signaling pathway is deregulated in human cervical cancer samples [17] and in small cell lung cancer induced by HPV E6/E7 oncoproteins [18]. Other researchers have shown that macaques treated with TCDD, an AHR agonist, develop squamous metaplasia in

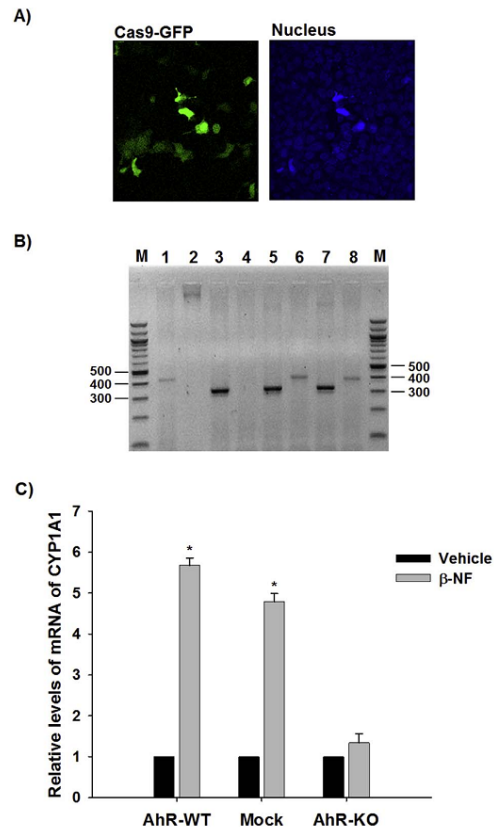


Fig. 8. Phenotypic analysis of HeLa cells transfected with gRNAs and pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458). (A) Cas9-GFP (green) and nuclear (blue) signals in HeLa cells 48 h after transfection. (B) Electrophoretic analysis of PCR genotyping products. Lane M, 100 bp marker ladder; lane 1, gDNA from nontransfected HeLa cells; lane 2, gDNA from mouse; lanes 3–8, gDNA from clones 1–6. The PCR products are 437 bp (*Ahr*-WT) and 353 bp (*Ahr*-KO). (C) *Ahr*-WT and *Ahr*-KO cells (clone 1) were treated with β -NF (1 μ M) for 2 h. CYP1A1 mRNA levels were determined by qPCR and normalized with GAPDH. Data are presented as the mean \pm S.D. of two independent experiments. * $p < .05$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

the cervix [19]. Moreover, an AHR deletion construct suppressed growth of human cervical tumor xenografts [20]. These and other studies suggest that inhibition of AHR through the use of antagonists might decrease the proliferation of cervical cancer cells. In the present study, we examined whether resveratrol and α -NF, two AHR antagonists, decrease cell proliferation in HeLa cells.

The AHR expression levels in HeLa cells are similar to those observed in HepG2 cells. TCDD treatment induced AHR nuclear translocation, and its activation with β -NF resulted in CYP1A1 mRNA induction. Together, these data indicate that AHR is functional in HeLa cells. Interestingly, an AHR signal was also observed in the nuclear fraction of untreated HeLa cells. Similarly, a previous report described nuclear AHR in untreated HeLa cells, but in a higher proportion [21]. Additionally, AHR signal was observed in plasma membrane in some untreated HeLa cells. Recently, Rey-Barroso et al. reported in immortalized T-FGM mouse fibroblast similar observations where in the absence of exogenous ligand a fraction of AHR was localized at the plasma membrane in a complex with Caveolin-1 modulating its

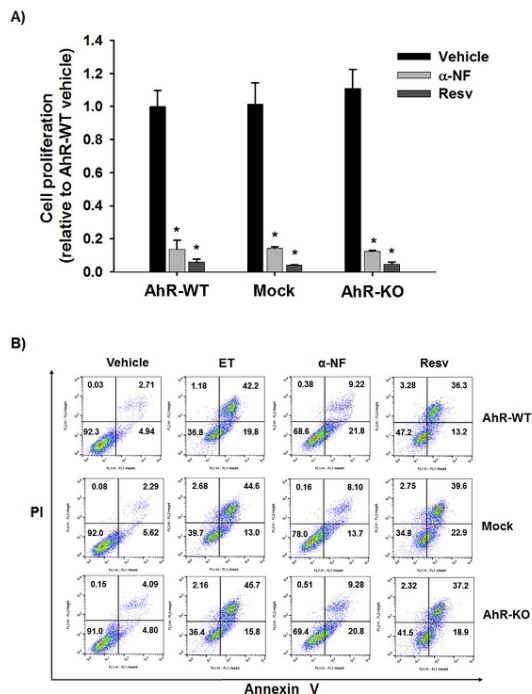


Fig. 9. Effects of α -NF and resveratrol treatments on cell proliferation and apoptosis levels in *Ahr*-WT and *Ahr*-KO HeLa cells. (A) Cells were treated with α -NF (50 μ M) or resveratrol (40 μ M), and the number of cells was determined on day 6. Data are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * p < .05. (B) Representative FACS histograms of cell cultures treated with ET (45 μ M), used as a positive control for apoptosis), α -NF (50 μ M), and resveratrol (40 μ M) for 36 h. The percentage of cells is indicated at the top of each quadrant of the histograms.

distribution [22].

As expected, 50 μ M α -NF and 40 μ M resveratrol blocked the CYP1A1 induction promoted by β -NF treatment to a similar degree, demonstrating their antagonistic activities towards β -NF. Although it was reported that 50 μ M α -NF induced CYP1A1 in 5L cells [23], in the present study, the same concentration failed to induce CYP1A1 mRNA in comparison to controls. This discordance may be due to differences in cell types, species, and treatment times.

α -NF decreases HeLa cell proliferation in a dose-dependent manner with an IC_{50} of 36.81 μ M. After 24 h of treatment, α -NF did not alter an asynchronously growing HeLa cell cycle distribution. However, after 48 h of treatment, according to the DNA distribution analysis, a delay in S phase was observed. In contrast to the present study, α -NF cytostatic effects were also reported in 5L cells, and similar concentrations of α -NF induced G1 arrest in 5L cells and G2/M arrest in Hepa1c1c7 cells [23]. These differences indicate that the check point at which cell cycle arrest occurs depends on cell type.

Resveratrol produced cytotoxic effects by decreasing HeLa cell proliferation with an IC_{50} of 21.76 μ M, which is lower than that observed for α -NF. Initially, resveratrol induced G1 arrest. However, 20 h later, there was a decrease in the percentage of cells in G1 phase (25.6% in treated cells vs. 53.7% in controls) together with an increase in cells in S phase (74.4% in treated cultures vs. 27.9% in control cultures). In addition, a lack of cells in G2/M phase (0.0% in treated cultures vs. 18.2% in control cultures) was observed. Similar results were reported previously when HeLa cells were treated for 24 h with 50 μ M resveratrol [24]. Other studies have shown that resveratrol treatment resulted

in arrest in the G1 phase in MDA-MB-231 human breast cancer cells, and arrest in the G2/M phase in HT-29 colon carcinoma cells [25] [26]. These differences may be due to the fact that these cell lines present different alterations.

Both α -NF and resveratrol induced apoptosis, and the latter had a more potent effect. The increase in apoptosis correlates with an increase in p53 protein levels. Once again, this effect was greater in cells that were treated with resveratrol.

To our surprise, knocking out the AHR did not affect α -NF or resveratrol-mediated cytostaticity/cytotoxicity or apoptosis. Previously, Reiners and colleagues [23] observed that α -NF presented cytostatic effects in BPS cells, a 5L cell variant deficient in AHR. Taken together with the present data, these results indicate that flavonoid- and polyphenol-induced apoptosis, and in particular α -NF- and resveratrol-induced apoptosis, are not dependent on AHR. The results indicate that α -NF and resveratrol act through other signaling pathways.

In lymphocytes and phagocytes, α -NF treatment increases apoptosis and also increases intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) [27]. α -NF also increased $[Ca^{2+}]_i$ in human endothelial HMEC-1 cells in an AHR-independent manner [28]. Intracellular calcium regulates several key steps in the apoptotic pathway, and it may be through this mechanism that α -NF induces apoptosis in HeLa cells. In fact, some PAHs have been shown to activate the ryanodine receptor-related calcium pathway [29] and induce apoptosis through a phospholipase A2-dependent mechanism [30]. On the other hand, in MCF-7 cells, the phosphorylation of tyrosine kinases has been implicated in the inhibition of apoptosis, and FAK and Pyk-2 levels were observed to decrease after α -NF treatment [31].

Resveratrol promotes apoptosis by interfering with a wide range of cellular events. In HeLa cells, it has the ability to induce the expression of the *TP53* gene apparently through E2F activation, which results in apoptosis [32]. Activation of E2F4/5 is also related to G1/S cell cycle arrest, which correlates with the cellular arrest phases observed in the present study. Alternatively, in colon carcinoma cells, resveratrol induces p53-dependent apoptosis through the activation of ATM kinase [33], and in several uterine cancer cell lines, resveratrol induces apoptosis by decreasing phospho-Akt and prostaglandin production [34]. In addition, results suggest that in HeLa cells resveratrol induces cell death through autophagy [35]. Recently, it was shown that resveratrol treatment induced mitochondrial Ca^{2+} uptake in HeLa cells, which is a hallmark of caspase activity [36]. Whatever the mechanism by which resveratrol induces apoptosis in HeLa cells, it is independent of the presence of AHRs.

Knocking out *AHR* did not result in a decrease in cell proliferation or apoptosis in comparison to control HeLa cells. These results contrast with those indicating that hepatocytes and embryonic fibroblasts from *Ahr*-null mice presented a decrease in the cell proliferation rate and an increase in apoptosis when compared to controls [16] [4]. Taken together, these data suggest that the role of AHR in cell proliferation and apoptosis is not only determined by cell type but also by the cell transformation state.

In conclusion, both α -NF and resveratrol decreased HeLa cell proliferation. At the same time, both treatments increased p53 levels and apoptosis in AHR-independent manner. More studies are needed to characterize the role of AHR in the proliferative and apoptotic processes, and future research should focus on cellular differences as well as differences in transformation state.

Funding

This work was supported by CONACYT grant 153377.

Acknowledgements

We thank Dr. Cabañas-Cortés and M.S. Martínez-Guzmán for his technical support.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.029>.

References

- [1] M. Stanley, Pathology and epidemiology of HPV infection in females, *Gynecol. Oncol.* 117 (2 Suppl) (2010) S5–S10.
- [2] D. Martinez-Zapien, F.X. Ruiz, J. Poison, A. Mitschler, J. Ramirez, A. Forster, A. Cousido-Siah, M. Masson, S. Vande Pol, A. Podjarny, G. Trave, K. Zanier, Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53, *Nature* 529 (7587) (2016) 541–545.
- [3] F.J. Gonzalez, P. Fernandez-Salguero, The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice, *Drug Metabol. Dispos.: the Biological Fate of Chemicals* 26 (12) (1998) 1194–1198.
- [4] G. Elizondo, P. Fernandez-Salguero, M.S. Sheikh, G.Y. Kim, A.J. Fornace, K.S. Lee, F.J. Gonzalez, Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast, *Mol. Pharmacol.* 57 (5) (2000) 1056–1063.
- [5] M. Tohkin, M. Fukuhara, G. Elizondo, S. Tomita, F.J. Gonzalez, Aryl hydrocarbon receptor is required for p300-mediated induction of DNA synthesis by adenovirus E1A, *Mol. Pharmacol.* 58 (4) (2000) 845–851.
- [6] M. Chopra, A.M. Dharmarajan, G. Meiss, D. Schrenk, Inhibition of UV-C light-induced apoptosis in liver cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *Toxicol. Sci.: An Official Journal of the Society of Toxicology* 111 (1) (2009) 49–63.
- [7] G. Paajarvi, M. Viluksela, R. Pohjanvirta, U. Stenius, J. Hogberg, TCDD activates Mdm2 and attenuates the p53 response to DNA damaging agents, *Carcinogenesis* 26 (1) (2005) 201–208.
- [8] O.D. Reyes-Hernandez, A. Mejia-Garcia, E.M. Sanchez-Ocampo, M.A. Cabanas-Cortes, P. Ramirez, L. Chavez-Gonzalez, F.J. Gonzalez, G. Elizondo, Ube2l3 gene expression is modulated by activation of the aryl hydrocarbon receptor: implications for p53 ubiquitination, *Biochem. Pharmacol.* 80 (6) (2010) 932–940.
- [9] A. Ambolet-Camoit, L.C. Bui, S. Pierre, A. Chevallier, A. Marchand, X. Coumoul, M. Garlatti, K. Andreau, R. Barouki, M. Aggerbeck, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin counteracts the p53 response to a genotoxicant by upregulating expression of the metastasis marker agr2 in the hepatocarcinoma cell line HepG2, *Toxicol. Sci.: An Official Journal of the Society of Toxicology* 115 (2) (2010) 501–512.
- [10] H.M. Korashy, A.O. El-Kadi, Regulatory mechanisms modulating the expression of cytochrome P450 1A1 gene by heavy metals, *Toxicol. Sci.: An Official Journal of the Society of Toxicology* 88 (1) (2005) 39–51.
- [11] K.M. Dolwick, J.V. Schmidt, L.A. Carver, H.I. Swanson, C.A. Bradfield, Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA, *Mol. Pharmacol.* 44 (5) (1993) 911–917.
- [12] W. Li, S. Donat, O. Dohr, K. Unfried, J. Abel, Ah receptor in different tissues of C57BL/6J and DBA/2J mice: use of competitive polymerase chain reaction to measure Ah-receptor mRNA expression, *Arch. Biochem. Biophys.* 315 (2) (1994) 279–284.
- [13] S.U. Vorrink, D.R. Hudachek, F.E. Domann, Epigenetic determinants of CYP1A1 induction by the aryl hydrocarbon receptor agonist 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126), *Int. J. Mol. Sci.* 15 (8) (2014) 13916–13931.
- [14] A.M. Brinkman, J. Wu, K. Erslund, W. Xu, Estrogen receptor alpha and aryl hydrocarbon receptor independent growth inhibitory effects of aminoflavone in breast cancer cells, *BMC Canc.* 14 (2014) 344.
- [15] C. Weiss, D. Faust, I. Schreck, A. Ruff, T. Farwerck, A. Melenberg, S. Schneider, B. Oesch-Bartlomowicz, J. Zatloukalova, J. Vondracek, F. Oesch, C. Dietrich, TCDD deregulates contact inhibition in rat liver oval cells via Ah receptor, JunD and Cyclin A, *Oncogene* 27 (15) (2008) 2198–2207.
- [16] H. Zaher, P.M. Fernandez-Salguero, J. Letterio, M.S. Sheikh, A.J. Fornace Jr., A.B. Roberts, F.J. Gonzalez, The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis, *Mol. Pharmacol.* 54 (2) (1998) 313–321.
- [17] J.S. Rader, J.P. Malone, J. Gross, P. Gilmore, R.A. Brooks, L. Nguyen, D.L. Crimmins, S. Feng, J.D. Wright, N. Taylor, I. Zigelboim, M.C. Funk, P.C. Huettner, J.H. Ladenson, D. Gius, R.R. Townsend, A unified sample preparation protocol for proteomic and genomic profiling of cervical swabs to identify biomarkers for cervical cancer screening, *Proteomics, Clinical Applications* 2 (12) (2008) 1658–1669.
- [18] T. Buonomo, L. Carrarsi, M. Rossini, R. Martinelli, Involvement of aryl hydrocarbon receptor signaling in the development of small cell lung cancer induced by HPV E6/E7 oncoproteins, *J. Transl. Med.* 9 (2011) 2.
- [19] M.A. Scott, R.P. Tarara, A.G. Hendrickx, K. Benirschke, J.W. Overstreet, B.L. Lasley, Exposure to the dioxin 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces squamous metaplasia in the endocervix of cynomolgus macaques, *J. Med. Primatol.* 30 (3) (2001) 156–160.
- [20] D. Wang, J.S. Faridi, Y. Li, W.K. Chan, A truncated human Ah receptor suppresses growth of human cervical tumor xenografts by interfering with hypoxia signaling, *FEBS Lett.* 583 (18) (2009) 3039–3044.
- [21] S.S. Singh, N.G. Hord, G.H. Perdew, Characterization of the activated form of the aryl hydrocarbon receptor in the nucleus of HeLa cells in the absence of exogenous ligand, *Arch. Biochem. Biophys.* 329 (1) (1996) 47–55.
- [22] J. Rey-Barroso, A. Alvarez-Barrientos, E. Rico-Leo, M. Contador-Troca, J.M. Carvajal-Gonzalez, A. Echarri, M.A. Del Pozo, P.M. Fernandez-Salguero, The Dioxin receptor modulates Caveolin-1 mobilization during directional migration: role of cholesterol, *Cell Commun. Signal.* CCS 12 (2014) 57.
- [23] J.J. Reiners Jr., R. Clift, P. Mathieu, Suppression of cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor, *Carcinogenesis* 20 (8) (1999) 1561–1566.
- [24] M.P. Kramer, J. Wesierska-Gadek, Monitoring of long-term effects of resveratrol on cell cycle progression of human HeLa cells after administration of a single dose, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1171 (2009) 257–263.
- [25] A. Kotha, M. Sekharam, L. Cilenti, K. Siddiquee, A. Khaled, A.S. Zervos, B. Carter, J. Turkson, R. Jove, Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein, *Mol. Canc. Therapeut.* 5 (3) (2006) 621–629.
- [26] Y.C. Liang, S.H. Tsai, L. Chen, S.Y. Lin-Shiau, J.K. Lin, Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells, *Biochem. Pharmacol.* 65 (7) (2003) 1053–1060.
- [27] S. Reynaud, C. Duchiron, P. Deschaux, 3-Methylcholanthrene induces lymphocyte and phagocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio* L) in vitro, *Aquat. Toxicol.* 66 (3) (2004) 307–318.
- [28] A. Mayati, E. Le Ferrec, D. Lagadic-Gossman, O. Fardel, Aryl hydrocarbon receptor-independent up-regulation of intracellular calcium concentration by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human endothelial HMEC-1 cells, *Environ. Toxicol.* 27 (9) (2012) 556–562.
- [29] J. Gao, A.A. Voss, I.N. Pessah, F.T. Lauer, T.M. Penning, S.W. Burchiel, Ryanodine receptor-mediated rapid increase in intracellular calcium induced by 7,8-benzo(a) pyrene quinone in human and murine leukocytes, *Toxicol. Sci.: An Official Journal of the Society of Toxicology* 87 (2) (2005) 419–426.
- [30] P.K. Tithof, M. Elgayyar, Y. Cho, W. Guan, A.B. Fisher, M. Peters-Golden, Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause endothelial cell apoptosis by a phospholipase A2-dependent mechanism, *Faseb. J. Offic. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16 (11) (2002) 1463–1464.
- [31] A. Datta, N. Bhasin, H. Kim, M. Ranjan, B. Rider, Z.Y. Abd Elmageed, D. Mondal, K.C. Agrawal, A.B. Abdel-Mageed, Selective targeting of FAK-Pyk2 axis by alpha-naphthoflavone abrogates doxorubicin resistance in breast cancer cells, *Canc. Lett.* 362 (1) (2015) 25–35.
- [32] F. Uchiumi, K. Shoji, Y. Sasaki, M. Sasaki, Y. Sasaki, T. Oyama, K. Sugisawa, S. Tanuma, Characterization of the 5'-flanking region of the human TP53 gene and its response to the natural compound, resveratrol, *J. Biochem.* 159 (4) (2016) 437–447.
- [33] B. Demoulin, M. Hermant, C. Castrogiovanni, C. Staudt, P. Dumont, Resveratrol induces DNA damage in colon cancer cells by poisoning topoisomerase II and activates the ATM kinase to trigger p53-dependent apoptosis, *Toxicol. Vitro: an International Journal Published in Association with BIBRA* 29 (5) (2015) 1156–1165.
- [34] E. Sexton, C. Van Themsche, K. LeBlanc, S. Parent, P. Lemoine, E. Asselin, Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells, *Mol. Canc.* 5 (2006) 45.
- [35] S.P. Garcia-Zepeda, E. Garcia-Villa, J. Diaz-Chavez, R. Hernandez-Pando, P. Gariglio, Resveratrol induces cell death in cervical cancer cells through apoptosis and autophagy, *Eur. J. Canc. Prev.* 22 (6) (2013) 577–584.
- [36] C.T. Madreiter-Sokolowski, B. Gottschalk, W. Parichatikanond, E. Eroglu, K. Klec, M. Waldeck-Weiermair, R. Malli, W.F. Graier, Resveratrol specifically kills cancer cells by a devastating increase in the Ca²⁺ coupling between the greatly tethered endoplasmic reticulum and mitochondria, *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 39 (4) (2016) 1404–1420.

12. APÉNDICE II

Trabajos en congresos

Presentación del póster “AhR inactivation by alpha-naphthoflavone and Resv inhibits cell proliferation by increasing p53 and apoptosis levels in HeLa cells” en el *10th International ISSX Meeting* celebrado del 29 de septiembre al 3 de octubre de 2013 en Toronto, Ontario, Canadá.