



**TESIS DOCTORAL**

**Implicación del receptor de aril hidrocarburos Ahr en la regeneración  
hepática y la esclerosis múltiple**

**Claudia M. Rejano Gordillo**

*Biología Molecular y Celular, Biomedicina y Biotecnología*

**2022**





**TESIS DOCTORAL**

**Implicación del receptor de aril hidrocarburos Ahr en la regeneración  
hepática y la esclerosis múltiple**

**Claudia M. Rejano Gordillo**

*Biología Molecular y Celular, Biomedicina y Biotecnología*

Con la conformidad del director:

**Pedro M. Fernández Salguero**

**2022**





**Departamento de Bioquímica y  
Biología Molecular y Genética**

**Unidad de Bioquímica y  
Biología Molecular**

Facultad de Ciencias  
Avda. Elvas s/n  
06006 – Badajoz (España)

Pedro M. Fernández Salguero, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular y adscrito al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura,

**CERTIFICA:**

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR DE ARIL HIDROCARBUROS AHR EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA Y LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE”, de la que es autora Claudia María Rejano Gordillo, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura.

Que, revisada la memoria presentada, el Director del trabajo considera que posee las condiciones requeridas para ser defendida como un trabajo de Tesis Doctoral. Por todo ello,

**AUTORIZA:**

Su presentación y defensa pública frente al tribunal designado al efecto de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 99/2011 de 28 de enero. Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expide el presente certificado en Badajoz a 16 de Marzo de 2022.

Fdo. Pedro M. Fernández Salguero



## **Financiación**

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a una ayuda para la Formación del Profesorado Universitario (REF. FPU17/00336) y una ayuda para traslados temporales a centros extranjeros a beneficiarios de este subprograma (REF. EST19/00244). Ambas concedidas por el Ministerio de Ciencia e Innovación.





# Resumen

En la presente Tesis Doctoral abordamos el papel fisiológico del receptor AHR en diferentes órganos y patologías, estudiando el papel de esta proteína en dos procesos de elevada relevancia fisiológica.

En el primer capítulo, estudiamos la implicación de Ahr en la regeneración hepática, utilizando como modelo la hepatectomía parcial de 2/3 del hígado (HPx). Los ratones carentes de Ahr mostraron una regeneración del hígado más eficiente. De este modo, tratamientos farmacológicos dirigidos a la inhibición transitoria del receptor podrían ser una estrategia terapéutica prometedora para acelerar la regeneración del hígado en diferentes contextos donde la integridad hepática se vea comprometida.

En el segundo capítulo, investigamos el papel de Ahr en la modulación del sistema inmune durante la esclerosis múltiple, empleando como modelo la Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE). En células dendríticas la señalización de Ahr controló la diferenciación y expansión de células T reguladoras. Así, en el contexto de la esclerosis múltiple, Ahr tendría un papel clínicamente relevante enfocado en el desarrollo de tratamientos inmunomodulares.



# Índice general

<b>Índice de figuras</b>	<b>xvi</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>xx</b>
<b>Introducción general</b>	<b>1</b>
1. Receptor de dioxina . . . . .	1
1.1. Estructura proteica del receptor . . . . .	4
1.2. Mecanismo de activación y localización celular . . . . .	5
1.3. Implicación fisiológica . . . . .	11
<b>1. Implicación del receptor de aril hidrocarburos Ahr en la regeneración hepática</b>	<b>17</b>
1.1. Resumen I / Summary I . . . . .	17
1.2. Introducción I . . . . .	21
1.2.1. El hígado . . . . .	21
1.2.1.1. Estructura anatómica . . . . .	21
1.2.1.2. Histología hepática: células y circulación del hígado	23
1.2.1.3. Fenotipo hepático de los ratones <i>knock-out</i> para Ahr . . . . .	26
1.2.2. La regeneración hepática . . . . .	30

## ÍNDICE GENERAL

---

1.2.2.1.	Hepatectomía parcial . . . . .	31
1.2.2.2.	Fases de la regeneración hepática . . . . .	31
1.2.2.3.	Rol de las células progenitoras hepáticas en la regeneración . . . . .	35
1.2.2.4.	Papel de AHR en la regeneración tisular . . . . .	37
1.3.	Objetivos I . . . . .	43
1.4.	Resultados I . . . . .	45
1.4.1.	Ahr es inducido y activado en la regeneración hepática independientemente de ligando exógeno . . . . .	45
1.4.2.	La ausencia de Ahr acelera la regeneración hepática tras la hepatectomía parcial . . . . .	45
1.4.3.	La deficiencia de Ahr afecta a la activación de la respuesta inmune innata en la fase inicial de la regeneración . . . . .	52
1.4.4.	Los marcadores de pluripotencia son modulados de forma dependiente de Ahr durante la regeneración hepática . . . . .	54
1.4.5.	Expansión de la “ <i>side population</i> ” en ausencia de Ahr . . . . .	57
1.4.6.	En ausencia de Ahr se produjo una regulación positiva de las vías de señalización de <i>Hippo/YAP</i> y <i>Wnt/<math>\beta</math>-catenina</i> . . . . .	58
1.4.7.	Los cambios en el perfil metabólico presentan diferencias en ausencia de Ahr durante la regeneración hepática . . . . .	60
1.4.8.	El trasplante de células hepáticas Ahr-/- mejoró el proceso regenerativo de ratones silvestres hepatectomizados . . . . .	65
1.5.	Discusión I . . . . .	69
1.6.	Conclusiones I / Conclusions I . . . . .	77
<b>2.</b>	<b>Implicación del receptor de aril hidrocarburos Ahr en la Esclerosis Múltiple</b>	<b>81</b>
2.1.	Resumen II / Summary II . . . . .	81
2.2.	Introducción II . . . . .	85
2.2.1.	Las células dendríticas . . . . .	85
2.2.1.1.	Rol de CD39 en células dendríticas . . . . .	87

2.2.1.2.	Efecto del ácido docosahexaenoico en las células dendríticas . . . . .	90
2.2.1.3.	AHR en células dendríticas . . . . .	92
2.2.2.	La esclerosis múltiple . . . . .	96
2.2.2.1.	Mecanismo patogénico . . . . .	97
2.2.2.2.	Modelo animal de la esclerosis múltiple: encefalomi- elitis autoinmune experimental ( <i>Experimental</i> <i>autoimmune encephalomyelitis</i> , EAE) . . . . .	103
2.2.2.3.	Función de las células dendríticas en los procesos patológicos de autoinmunidad del sistema nervio- so central . . . . .	104
2.2.2.4.	Microbiota intestinal: AHR y probióticos en la EM	106
2.3.	Objetivos II . . . . .	113
2.4.	Resultados II . . . . .	115
2.4.1.	Ahr en células dendríticas limita el desarrollo de la EAE. .	115
2.4.2.	Ahr impulsa la expresión de CD39 en células dendríticas . .	115
2.4.3.	ENTPD1 en células dendríticas limita el desarrollo de EAE	117
2.4.4.	El metabolismo de los ácidos grasos está impulsado por Ahr	120
2.4.5.	El tratamiento con DHA en células dendríticas limita las respuestas proinflamatorias . . . . .	121
2.4.6.	Efectos en células dendríticas de los ligandos endógenos de Ahr derivados del metabolismo de la microbiota . . . . .	122
2.4.7.	Regulación de la respuesta inmune de las células dendríticas mediada por los ligandos endógenos de Ahr . . . . .	126
2.4.8.	El tratamiento con probióticos productores de IAA con efecto inmunorregulador en la EAE . . . . .	129
2.4.9.	EcN <sup>IAA</sup> afecta a la diferenciación de las células T . . . . .	133
2.5.	Discusión II . . . . .	139
2.6.	Conclusiones I / Conclusions I . . . . .	147

**Materiales y Métodos** **151**

1.	Modelos animales . . . . .	151
----	----------------------------	-----

## ÍNDICE GENERAL

---

2.	Genotipado . . . . .	154
3.	Modelo de regeneración hepática: hepatectomía parcial . . . . .	156
4.	Trasplante de hepatocitos primarios a través del bazo . . . . .	158
4.1.	Obtención células hepáticas primarias . . . . .	159
5.	Aislamiento de células hepáticas con fenotipo indiferenciado ( <i>stem-like</i> ): <i>Side Population</i> . . . . .	162
6.	Obtención de plasma sanguíneo . . . . .	163
7.	Medida de la glucosa en sangre . . . . .	164
8.	Medida de la actividad Hexoquinasa . . . . .	164
9.	Modelo de la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) . . . . .	164
10.	Aislamiento celular del SNC . . . . .	165
11.	Aislamiento y cultivo de células esplénicas . . . . .	166
12.	Tratamientos celulares . . . . .	166
13.	Ensayos <i>in vitro</i> de sobreexpresión . . . . .	167
13.1.	Vectores de expresión . . . . .	167
13.2.	Transformación de células competentes y midipreparación . . . . .	168
13.3.	Transfección transiente . . . . .	168
14.	Actividad de la luciferasa . . . . .	169
15.	Análisis de niveles proteicos mediante <i>Western-blot</i> . . . . .	169
15.1.	Preparación de extractos proteicos . . . . .	169
15.1.1.	Extracción de proteína total . . . . .	169
15.1.2.	Extracción de la fracción proteica nuclear y citoplasmática . . . . .	170
15.2.	Medida de la concentración de proteínas . . . . .	170
15.3.	Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y transferencia a membranas de nitrocelulosa . . . . .	171
16.	Tinción de secciones con hematoxilina y eosina . . . . .	173
17.	Inmunofluorescencia de tejidos . . . . .	173
18.	Análisis de citoquinas mediante ELISA . . . . .	174
19.	Análisis de citometría de flujo o FACS. . . . .	175
19.1.	Análisis de DC . . . . .	175
19.2.	Análisis de células T . . . . .	176

19.3.	DC aisladas de un ratón P65 <i>reporter</i> . . . . .	177
20.	Análisis de la expresión génica . . . . .	177
20.1.	Extracción de RNA . . . . .	177
20.1.1.	Extracción del RNA total a partir de tejidos . . .	177
20.1.2.	Extracción del RNA total a partir de cultivos ce- lulares . . . . .	178
20.1.3.	Extracción del RNA total a partir de muestras limitadas . . . . .	178
20.2.	Transcripción reversa . . . . .	178
20.3.	Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR . . . . .	179
21.	Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) . . . . .	179
22.	Probióticos sintéticos . . . . .	183
22.1.	Producción de EcN y EcnIAA . . . . .	183
22.2.	Administración de los probióticos: <i>Gavages</i> . . . . .	183
22.3.	Cinética de producción de IAA in vitro . . . . .	185
22.4.	Viabilidad de las bacterias tras la administración <i>in vivo</i> . .	186
22.5.	Biodistribución de los probióticos . . . . .	186
23.	Análisis estadístico . . . . .	186
<b>Bibliografía</b>		<b>187</b>
<b>Nomenclatura</b>		<b>273</b>

## ÍNDICE GENERAL

---



# Índice de figuras

1.	Esquema de la estructura de varios miembros de la familia de reguladores transcripcionales bHLH/PAS: . . . . .	5
2.	Modelo de transducción de señales mediadas por el heterodímero AHR/ARNT que muestra los cambios en la distribución celular de sus componentes tras la activación por unión de ligandos . . . . .	6
1.1.	Los segmentos anatómicos del hígado se delimitan por la distribución de los sistemas venoso hepático y portal: . . . . .	22
1.2.	Anatomía macroscópica del hígado y la vesícula biliar. . . . .	24
1.3.	Estructura del lobulillo hepático: . . . . .	27
1.4.	Fenotipo hepático de los ratones <i>Ahr</i> <sup>-/-</sup> comparado con el de ratones silvestres . . . . .	28
1.5.	Las cuatro fases de la regeneración hepática basada en la proliferación celular . . . . .	32
1.6.	Cinética temporal de la síntesis de ADN en diferentes tipos de células hepáticas durante la regeneración del hígado después de una hepatectomía parcial . . . . .	33
1.7.	Ahr se induce y activa en el hígado después de la HPx. . . . .	46
1.8.	Análisis microscópico de la estructura hepática 48 h tras la HPx. . . . .	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

1.9. La ausencia de Ahr aumenta la regeneración hepática después de la HPx. . . . .	48
1.10. Las tasas de proliferación aumentan en los hígados de ratones <i>Ahr</i> <sup>-/-</sup> después de la HPx. . . . .	50
1.11. Los marcadores de proliferación aumentaron en hígados de ratones <i>Ahr</i> <sup>-/-</sup> después de la HPx. . . . .	51
1.12. La deficiencia de Ahr mejora la respuesta inmune al inicio de la regeneración. . . . .	53
1.13. Mayor activación de las respuestas reguladas por TNF $\alpha$ e IL6 en ausencia de Ahr tras la HPx. . . . .	54
1.14. Ahr regula de forma directa la expresión de las citoquinas en la fase inicial de la regeneración. . . . .	55
1.15. Los marcadores de pluripotencialidad se modulan de manera dependiente de Ahr. . . . .	56
1.16. La falta de Ahr expande la “ <i>Side Population</i> ”. . . . .	57
1.17. La ausencia de Ahr aumenta la expresión de los marcadores de pluripotencia en el hígado en regeneración. . . . .	59
1.18. Los hígados sin Ahr muestran una regulación positiva de la ruta <i>Hippo</i> . . . . .	61
1.19. Los hígados sin Ahr muestran una regulación positiva de la ruta <i>Wnt</i> / $\beta$ - <i>catenina</i> . . . . .	62
1.20. Cambios en el metabolismo de la glucosa en ausencia de Ahr durante la regeneración hepática. . . . .	63
1.21. Cambios en el metabolismo lipídico en ausencia de Ahr durante la regeneración hepática. . . . .	64
1.22. Regulación de AKT mediada por Ahr durante la regeneración hepática. . . . .	66
1.23. El trasplante de células <i>Ahr</i> <sup>-/-</sup> potencia la regeneración hepática. . . . .	67
2.1. La plasticidad transcripcional de las células dendríticas determina la diferenciación de células T CD4 <sup>+</sup> in vivo. . . . .	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

2.2. ATP y Ado están involucrados en la regulación de la inflamación de los tejidos. . . . .	91
2.3. La activación del receptor de hidrocarburo de arilo (AHR) tiene múltiples efectos en DC y células T. . . . .	93
2.4. Las células inmunes autorreactivas se activan en los ganglios linfáticos periféricos después de la presentación de antígenos. . . . .	99
2.5. Las células inmunitarias autorreactivas se extravasan al SNC como resultado de interacciones con moléculas de adhesión y la secreción de MMP. . . . .	100
2.6. Daño al SNC causado por células inmunes activadas. . . . .	102
2.7. Resultados representativos de EAE en ratones. . . . .	104
2.8. Función de las DC en la autoinmunidad del SNC. . . . .	105
2.9. El eje microbiota-SNC en el contexto de varios trastornos neurodegenerativos . . . . .	107
2.10. En el intestino se produce la presentación y se promueve la diferenciación de las células T CD4+ como pueden ser Th17, Treg, linfocitos intraepiteliales (IEL) y linfocitos de lámina propia (LPL). . . . .	108
2.11. Ahr en las células dendríticas limita el desarrollo de la EAE. . . . .	116
2.12. Ahr dirige la expresión de CD39 en DC. . . . .	117
2.13. CD39 en las células dendríticas (DC) controla las poblaciones de células T y el desarrollo de EAE. . . . .	118
2.14. Cambios de expresión en las DC al silenciar CD39. . . . .	119
2.15. CD39 en DC limita la activación de células T. . . . .	120
2.16. La expresión génica de <i>Fads3</i> es regulada por Ahr en DC y participa en la EAE. . . . .	121
2.17. Cambios de expresión génica en DC al tratar con DHA. . . . .	123
2.18. Efectos paracrinós del DHA. . . . .	124
2.19. Ahr se activa transcripcionalmente en las DC de forma dependiente de la unión de ligandos endógenos producidos por la microbiota. . . . .	125
2.20. Los ligandos endógenos de Ahr no activan NF- $\kappa$ en DC. . . . .	127

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

2.21. Cambios de expresión génica en las DC tras el tratamiento con IAA. . . . .	128
2.22. IAA modula la función de las DC <i>in vitro</i> al modular la diferenciación de células T efectoras. . . . .	130
2.23. Biodistribución del IAA producido por EcN <sup>IAA</sup> (Syn2342). . . . .	131
2.24. Los probióticos productores IAA suprimen la autoinmunidad del SNC. . . . .	132
2.25. El tratamiento con EcN <sup>IAA</sup> aumenta la expresión de las DC y disminuye la expresión de genes proinflamatorios. . . . .	134
2.26. EcN <sup>IAA</sup> aumenta la expresión de genes propios de Tregs <i>in vitro</i> . . . . .	135
2.27. EcN <sup>IAA</sup> aumenta la población de células Tregs <i>in vitro</i> . . . . .	136
2.28. EcN <sup>IAA</sup> aumenta la expresión de genes característicos de Tregs <i>in vivo</i> . . . . .	137
M. 1. Esquema de la modificación genética en la que se basa el modelo murino R26R-YFP . . . . .	153
M. 2. Fragmentos de PCR correspondientes a las diferentes estrategias de genotipado . . . . .	155
M. 3. Esquema de la cirugía llevada a cabo en el modelo de hepatectomía parcial 2/3 . . . . .	157
M. 4. Esquema de la perfusión hepática llevada a cabo para obtener los cultivos primarios de hepatocitos de ratón. . . . .	162
M. 5. Aislamiento de células madre <i>Side Population</i> . . . . .	163
M. 6. Estrategia seguida para la síntesis de EcN <sup>IAA</sup> . . . . .	184
M. 7. Administración de probióticos mediante <i>gavage</i> . . . . .	185

# Índice de tablas

1.	Relación de los componentes del complejo AHR citosólico o nuclear y su efecto en la actividad del receptor . . . . .	6
2.	Relación de las proteínas que interaccionan con AHR y su efecto en la actividad del receptor . . . . .	7
3.	Consecuencia del estado de fosforilación en la señalización de AHR	10
4.	Relación de los factores que interaccionan con AHR y su efecto en la represión de actividad transcripcional de AHR . . . . .	10
5.	Papel dual de AHR en la proliferación de las células tumorales . .	14
2.1.	Efecto de la activación de AHR por diversos ligandos endógenos (e) o exógenos (E) en DC. . . . .	94
M. 1.	Secuencia de oligonucleótidos cebadores y condiciones del genotipado de los ratones empleados en el CAPÍTULO I. . . . .	156
M. 2.	Medios empleados para la obtención de células hepáticas mediante digestión enzimática con colagenasa. . . . .	159
M. 3.	Anticuerpos empleados en el protocolo de <i>Western Blot</i> . . . . .	172
M. 4.	Anticuerpos empleados en el protocolo de <i>Western Blot</i> . . . . .	180
M. 5.	Referencias de los <i>primers</i> usados con la sonda TaqMan. . . . .	181
M. 6.	<i>Primers</i> empleados para el análisis de secuencias de DNA obtenidas tras la inmunoprecipitación de cromatina . . . . .	182

## ÍNDICE DE TABLAS

---

# Introducción general

## 1. Receptor de dioxina

En 1976 Aland Poland descubrió el receptor de dioxina o AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor) en el citoplasma de células hepáticas de ratón, siendo descrito como una proteína implicada en la destoxicación de xenobióticos. Identificándose como una proteína implicada en el mecanismo de inducción de enzimas destoxicantes, como por ejemplo el citocromo P450 CYP1A1 [1], [2]. Durante los años siguientes, se describió la translocación al núcleo del receptor dependiente de su unión a ligandos exógenos, generalmente hidrocarburos policíclicos aromáticos [1], [3]. Este hallazgo y la descripción de la proteína ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) permitieron el trazado de un mecanismo molecular básico de acción del receptor [4].

A mediados de los 90, la producción de ratones mutantes por técnicas de gen *knock-out* confirmaron el papel toxicológico del receptor: los ratones carentes del receptor (*Ahr*<sup>-/-</sup>) eran resistentes a los efectos tóxicos y carcinogénicos de xenobióticos como la dioxina TCDD (2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina) y el Benzo-a-pireno (BP) [5]-[7]. Numerosos estudios moleculares *in vitro* permitieron definir a AHR como un factor de transcripción que se activaba por la unión a un ligando, dentro de un gran número de compuestos xenobióticos tales como hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs, *Halogenated Aromatic Hydrocarbons*),

## 1. RECEPTOR DE DIOXINA

---

compuestos policíclicos aromáticos (PAHs, *Policyclic Aromatic Hydrocarbons*) y bifenilos policlorinados (PCBs, *Polichlorinated Biphenyls*). Muchos de estos compuestos son potentes tóxicos ambientales generados por la actividad humana y sus procesos tóxicos y carcinogénicos son, en general, consecuencia de la inducción de enzimas destoxicantes hepáticas de las fases I y II como citocromos P450 (CYP450) de la superfamilia 1 (CYP1A1, 1A2, 1B1 y 1S1), la aldehído deshidrogenasa citosólica (ALDH3c) y la UDP glucuronosiltransferasa-1 (UGT1\*06) [6], [8], [9]. En paralelo, intensas investigaciones de los modelos murinos Knock-out para Ahr (*Ahr*<sup>-/-</sup>) revelaron un inesperado papel fisiológico del receptor, pues estos ratones presentan *per se* múltiples cambios fenotípicos como alteraciones reproductoras, patologías hepáticas y cardíacas, y defectos en los sistemas vascular e inmune [5], [10]-[15].

La búsqueda del papel fisiológico del receptor no carece de apoyo evolutivo, ya que éste se encuentra altamente conservado entre especies de vertebrados [16], mostrando un patrón de expresión constitutivo durante el desarrollo embrionario y en tejidos del individuo adulto [17]. Además, el gen que lo codifica está presente en el genoma de toda la escala de Metazoos, los cuales surgieron evolutivamente millones de años antes de la existencia de dioxinas en la Biosfera. Por tanto, actualmente está ampliamente aceptado que AHR cumple una importante función en la biología, el desarrollo y las funciones fisiológicas celulares [18]-[22]. No obstante, aún se desconoce buena parte de las rutas y los mecanismos moleculares, los intermediarios con los que interacciona y los genes diana regulados por AHR en ausencia de xenobióticos. Esto puede deberse a que sus funciones endógenas puedan quedar enmascaradas por el uso abusivo de compuestos xenobióticos. Por ello, la modulación de procesos toxicológicos mediada por AHR puede ser un mecanismo adaptativo a la aparición de xenobióticos en la Biosfera, de tal manera que su función toxicológica podría representar una versión exacerbada de su función fisiológica [23]. Así, por un lado, la activación de AHR por ligandos como TCDD o BP provoca bloqueo de la replicación del DNA, parada del ciclo celular en G0/G1 y G2/M y la inhibición de la proliferación celular [24]. Sin embargo, por otro lado, en ausencia de estos compuestos, AHR tiene la capacidad basal de promover la progresión del ciclo celular en fibroblastos embrionarios, ya que las



células *Ahr*<sup>-/-</sup> presentan una menor proliferación y una mayor tasa apoptótica que las silvestres [12], [20].

El rol de AHR como factor de transcripción ha derivado en la búsqueda de sus dianas transcripcionales fisiológicas durante los últimos años de investigación del receptor. Se ha demostrado que AHR participa bajo condiciones fisiológicas en el control transcripcional de diversidad de genes como: la DNA polimerasa kappa [25], N-miristoiltransferasa 2 [26], p27kip1 [27], Bax [28], T-Cadherina [29], c-Myc [30], Slug/SNAI2 [31], Vav3 [32], la proteína de unión a TGF $\beta$  latente LTBP1 (*Latent Transforming Growth Factor Binding Protein-1*) [33] y la proteína de maduración de linfocitos B [34], entre otros. Además, el análisis de microarrays de expresión en condiciones de presencia vs ausencia de xenobióticos ha identificado un número relevante de genes potencialmente regulados por AHR, una fracción de los cuales está relacionada con funciones endógenas y con la homeostasis celular, pero no con el metabolismo de xenobióticos [35]-[37]. Aún más, otros estudios muestran que AHR también puede actuar como cofactor y modular la actividad de reguladores transcripcionales relevantes en la fisiología celular, entre ellos se encuentran los genes de pluripotencia y diferenciación, OCT4 y NANOG [38]-[40]; NF- $\kappa$  B (*Nuclear factor-kappa B*), que media reacciones inflamatorias y estrés oxidativo [41]; pRb (proteína retinoblastoma fosforilada), la cual regula la transición G1/S en el ciclo celular [42]; y el receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ , *estrogen receptor*), proteína con funciones en el desarrollo celular, la reproducción y el cáncer [43], [44].

Independientemente de su función transcripcional, pero en relación con la fisiología celular, AHR parece participar directamente en rutas de señalización activadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*, MAPK) [45]; por estrógenos [46], [47]; por la proteína quinasa c-Src [48], [49]; o ser constituyente del complejo de señalización de membrana plasmática formado por la integrina  $\beta$ 1, c-Src, CBP/CSK y Caveolina 1 [50], [51]. Por último, se ha descrito que AHR puede tener actividad E3 ubiquitina ligasa dependiente de ligando [52].

## 1. RECEPTOR DE DIOXINA

---

### 1.1. Estructura proteica del receptor

En 1992 se llevó a cabo la clonación y secuenciación del gen que codifica para AHR, lo que permitió considerarlo miembro de la superfamilia de factores de transcripción con secuencias del tipo *basic-Helix-Loop-Helix* (bHLH) de clase VII. Estos factores de transcripción se activan mediante la unión de un ligando exógeno, lo cual es una característica diferencial [53], [54]. Esta superfamilia de proteínas incluye también los reguladores de la transcripción con dominio PAS: Per (*Period*, proteína que mantiene el ritmo circadiano en *Drosophila melanogaster*), ARNT (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) y Sim (*Single Minded*, proteína reguladora del desarrollo del sistema nervioso central de *Drosophila melanogaster*). Por ello, a esta superfamilia de factores de transcripción se la conoce como bHLH/PAS (*basic Helix-Loop-Helix/Per-ARNT- Sim*). Se sabe que las proteínas bHLH/PAS están implicadas en el control de procesos fisiológicos diversos tales como embriogénesis, desarrollo neuronal, ritmo circadiano, angiogénesis, metabolismo y respuesta a hipoxia [12], [55]-[59].

El dominio bHLH se localiza en el extremo amino terminal de la proteína, de modo que mientras que la región básica es responsable de la unión al DNA, el dominio HLH es necesario para la heterodimerización con ARNT. Asimismo, en el extremo amino terminal de la proteína, se ha identificado una región NLS (*Nuclear Localization Signal*) la cual es reconocida por dos componentes del complejo que forman el poro nuclear (**Figura 1**). Adicionalmente, AHR presenta dos regiones NES (*Nuclear Export Signal*), una en el dominio bHLH y otra en el dominio PAS-A; ambas ricas en leucina y reconocidas por la proteína CRM1 (*Chromosome Region Maintenance 1*) [60], [61].

En el extremo carboxilo se encuentra el segmento de homología PAS, que está formado por dos copias de una repetición degenerada de unos 50 aminoácidos denominados PAS-A y PAS-B, separadas entre sí por otros 110 aminoácidos. La región PAS-B contiene parte del dominio de unión al ligando y la región necesaria para la interacción con el chaperón Hsp90 (*Heat shock protein 90 kDa*) [62]. En el extremo C-terminal de AHR, ARNT y Sim se encuentra una región rica en glutamina (Q), similar a los dominios de transactivación presentes en

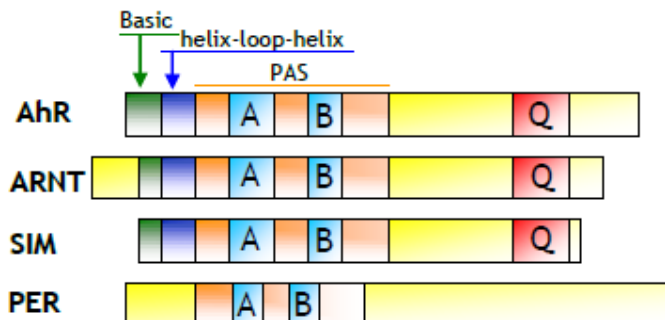


Figura 1: Esquema de la estructura de varios miembros de la familia de reguladores transcripcionales bHLH/PAS: AHR y ARNT de ratón, y SIM y PER de *Drosophila melanogaster*. Se indican las regiones de homología y los dominios funcionales de cada proteína.

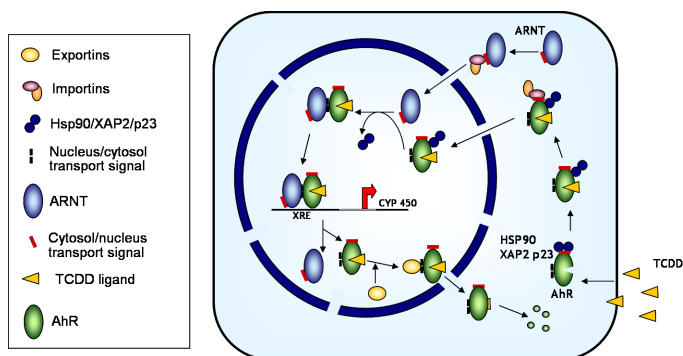
otros factores de transcripción, cuya delección no afecta a la unión al DNA ni a la interacción con el ligando [57]. Esta región C-terminal permitiría a AHR interactuar con diversos co-activadores, no caracterizados completamente, que determinarían la tasa final de transcripción.

## 1.2. Mecanismo de activación y localización celular

Diversos factores tanto agentes químicos como biológicos, pueden modificar la actividad transcripcional de AHR. Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados se han centrado en la activación mediada por la unión de ligandos exógenos y la consiguiente inducción de sus genes diana como *Cyp1a1* y *Cyp1b1*. La regulación de la actividad transcripcional de AHR en ausencia de xenobióticos es uno de los aspectos menos conocidos de la funcionalidad de este receptor.

En la **Figura 2** se recoge el mecanismo de acción propuesto para la activación transcripcional de genes dependientes de AHR tras la unión del xenobiótico TCDD. En ausencia de TCDD, la forma inactiva de AHR se encuentra predominantemente en el citosol asociada a un complejo de chaperones moleculares que al menos incluye (**Tabla 1**): dos moléculas de Hsp90, que mantienen a AHR en

## 1. RECEPTOR DE DIOXINA



**Figura 2:** Modelo de transducción de señales mediadas por el heterodímero AHR/ARNT que muestra los cambios en la distribución celular de sus componentes tras la activación por unión de ligandos [19].

**Tabla 1:** Relación de los componentes del complejo AHR citosólico o nuclear y su efecto en la actividad del receptor

Factor	Consecuencia funcional
Hsp90	Mantiene AHR en conformación de unión a ligando e impide la dimerización con ARNT [63], [70]
AIP/ARA9/XAP2	Estabiliza AHR y favorece su localización citoplasmática [65], [71]
p23	Liberación de Hsp90 de AHR [64]
ARNT	Heterodimeriza con AHR para formar el complejo AHR/ARNT [72]

una conformación proclive a la unión de ligando e impiden su unión temprana a ARNT [63]; una molécula de la proteína p23, que promueve la liberación de las Hsp90 tras la unión del ligando [64]; y una inmunofilina XAP2 (*Hepatitis B virus X-Associated Protein 2*) [65], también conocida como ARA9 (*AHR-Associated Protein 9*) [66] o AIP (*AHR-Interacting Protein*) [67]. Esta última molécula estabiliza la localización citoplásmica de AHR y evita su degradación temprana vía proteosoma en ausencia de ligando [68], [69].

## 1. RECEPTOR DE DIOXINA

---

Cuando AHR es activado por la unión de un ligando, se liberan del receptor Hsp90 y las demás proteínas chaperonas asociadas. Entonces, se transloca al núcleo donde se acumula, con lo que se favorece la formación de heterodímeros activos AHR/ARNT en una relación molecular 1:1. Al contrario de lo que se pensó inicialmente, y por lo que se le dio nombre, ARNT (*AHR Nuclear Translocator*) no interviene en el proceso de translocación nuclear de AHR [73]. Los heterodímeros AHR/ARNT tienen la capacidad de unión al DNA [64], [74], [75] en secuencias consenso denominadas XREs o DREs (*Xenobiotic/Dioxin Response Elements*). Principalmente, se encuentran situadas en regiones promotoras de genes diana y contribuyen a incrementar o reprimir la transcripción de los mismos [29], [33]. La secuencia consenso establecida para el sitio XRE es 5'-GCGTG-3' [72].

A la actividad transcripcional de los receptores nucleares del tipo de AHR contribuyen también co-factores transcripcionales ubicuos (**Tabla 2**). En el caso de AHR/ARNT, se ha descrito que el complejo p300/CBP (*cAMP response element binding protein*, CREB) facilita la interacción entre el heterodímero AHR/ARNT y los componentes de la maquinaria transcripcional asociados a la caja TATA. Esta interacción se realiza a través de ARNT [76]. También participan varios miembros de la familia SRC (*Steroid Receptor Coactivator*) que se unen a AHR a través de la región rica en glutamina próxima a su extremo C-terminal [77]. Se ha observado que AHR interacciona con SRC-1, NCoA-2 y p/CIP en el promotor del gen *Cyp1a1* cuando éste se encuentra unido a ligando [78]. El co-activador RIP140 (*Receptor Interacting Protein 140*) se une a AHR y aumenta su actividad transcripcional.

**Tabla 2: Relación de las proteínas que interaccionan con AHR y su efecto en la actividad del receptor**

<b>Factor</b>	<b>Consecuencia funcional</b>
SRC-1, NCoA-2, p300/CBP, p/CIP	Coactivadores con actividad HAT que interaccionan con AHR y/o ARNT y facilitan la activación transcripcional [78]

## 1. RECEPTOR DE DIOXINA

---

<b>Factor</b>	<b>Consecuencia funcional</b>
RIP140	Se une a AHR y aumenta la transcripción de genes con XREs [79]
SMRT, SHP	Inhibe la actividad transcripcional del complejo AHR/ARNT [80], [81]
Brg-1	Factor que modifica histonas dependiendo de actividad ATPasa y aumenta la transcripción mediada por el complejo AHR/ARNT [82]
Med220, CDK8	Subunidades del complejo mediador involucrado en la activación transcripcional por AHR/ARNT [83]
PolIII, TBP, TFIIB, TFIIF	Componentes de la maquinaria general de transcripción que están directamente involucrados en la activación de genes diana de AHR
NF-1	Factor de transcripción involucrado en la inducción del <i>Cyp1a1</i> por AHR mediante su interacción con la caja CAAT [84]
Sp1	Aumenta la regulación de genes controlados por AHR/ARNT [85]
ER $\alpha$	Interacciona funcionalmente con AHR en regulación génica [86]
NF- $\kappa$ B	Interacción entre AHR y la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B. La activación de NF- $\kappa$ B suprime la expresión de <i>Cyp1a1</i> [41]
RB	Interacción directa entre Rb y AHR necesaria para la máxima inducción de <i>Cyp1a1</i> , sugiriendo un papel de coactivador para RB [87]-[89]
HIF-1 $\alpha$	La hipoxia inhibe la actividad transcripcional de AHR por competición con ARNT [90]
Mybbp1a	Se asocia con AHR y favorece la transactivación [91]
Nedd8	Interacciona con AHR aumentando su acumulación nuclear y su actividad transcripcional [92]

## 1. RECEPTOR DE DIOXINA

---

Cuando la regulación transcripcional de los genes diana ha concluido, AHR se disocia de ARNT, quedando accesible su región NES de exportación nuclear y reconocible por CMR1. La unión AHR-CMR1 induce el transporte del receptor al citosol donde es ubiquitinado y degradado por el proteasoma [69], [93], [94].

Algunos estudios han mostrado indirectamente que, aunque en ausencia de ligando exógeno la mayor parte de AHR se localiza en el citoplasma celular, una fracción apreciable de receptor es activamente transportada desde el citoplasma hasta el núcleo en un flujo constante [95], [96]. En presencia del ligando exógeno, la distribución del receptor hacia su acumulación nuclear incrementa significativamente. Concretamente, en células HeLa el 15-20 % del total de AHR se encuentra localizado en el núcleo en ausencia de ligando, donde dimeriza con ARNT y es transcripcionalmente activo [97]. A su vez, en la línea celular de queratinocitos humanos immortalizados HaCaT [98] o en fibroblastos murinos [50], la localización intracelular de AHR depende de la densidad celular, siendo mayoritariamente nuclear a baja densidad y citoplasmática a confluencia.

Existen diferentes condiciones celulares en las que se produce regulación de la actividad del receptor independiente de ligando (**Tabla 2**), entre ellas: (1) la expresión del co-activador RIP140 aumenta la actividad de promotores regulados por AHR, tanto en presencia como en ausencia de ligando [79]; (2) en cultivos de queratinocitos [99] o de fibroblastos C3H10T1/2 [100] creciendo en monocapa, la pérdida del contacto célula-célula provoca la activación transcripcional de AHR; (3) el estado de fosforilación de AHR (**Tabla 3**) influye en su distribución celular, siendo relevante su fosforilación por proteína quinasa C (*Protein Kinase C*, PKC) en los residuos Ser12 y Ser36 [97], y también afecta en su activación transcripcional [101], [102]; (4) la unión de XAP2 a AHR previene su translocación al núcleo [71] por reclutamiento de la fosfodiesterasa 2A (*cGMP-dependent 3',5'-cyclic phosphodiesterase*, PDE2A) y por reducción de los niveles locales de cAMP [103]; y (5) la actividad transcripcional de AHR es regulada por la inhibición del proteasoma en fibroblastos embrionarios (*mouse embryonic fibroblast*, MEFs) y en células de hepatoma de ratón Hepa-1 [94], [104] a través de un mecanismo que implica la activación de PKC por el regulador transcripcional ubicuo Sp1 [105].

En la mayoría de estos mecanismos no mediados por ligando, una vez que

## 1. RECEPTOR DE DIOXINA

---

**Tabla 3: Consecuencia del estado de fosforilación en la señalización de AHR**

Factor	Consecuencia funcional
PKC	Aumenta la activación transcripcional de AHR/ARNT dependiente de ligando. El mecanismo es desconocido [106]
c-Src	Tirosina quinasa asociada a AHR y que es activada por ligandos del receptor [107], [108]
AMPC	Produce la acumulación de AHR en el núcleo sin que éste interaccione con ARNT [109]

**Tabla 4: Relación de los factores que interaccionan con AHR y su efecto en la represión de actividad transcripcional de AHR**

Factor	Consecuencia funcional
AHRR	Regula negativamente la función de AHR al dimerizar con ARNT y unirse a XRE [113]
AINT	Se une a ARNT y disminuye su localización [114]
ADPF	Factor involucrado en la degradación proteosomal de AHR nuclear [93], [115]

AHR es nuclear, es transcripcionalmente activo. Sin embargo, otros estudios han sugerido una función reguladora negativa para AHR (**Tabla 4**). De tal modo que al unirse a las secuencias XRE localizadas en los promotores impide el acceso de otros factores de transcripción resultando en una represión génica [110]-[112].

Otro mecanismo que provoca la inhibición de la transcripción es el mediado por la proteína denominada represor de AHR (*AHR Repressor*, AHRR) [113] (**Tabla 4**). Esta proteína, con estructura del tipo bHLH, inhibe la actividad transcripcional de AHR compitiendo con éste por la formación de heterodímeros con ARNT, de tal manera que los complejos AHRR/ARNT son transcripcionalmente inactivos. Su expresión génica es regulada positivamente por AHR, pudiendo considerarse un mecanismo propio de retroalimentación negativa para



evitar la sobreactivación del receptor. Así la activación de AHR por unión de ligando exógeno aumenta la expresión de AHRR y, por ello, en ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> los niveles de dicho represor es dos veces menor que en ratones silvestres [116].

En relación con ARNT, estudios inmunohistoquímicos han mostrado que esta proteína se localiza mayoritariamente en el núcleo. La activación de AHR por TCDD no modifica su distribución celular ni su nivel de expresión [117]. Además, al contrario de lo que se pensó inicialmente y por lo que se le dio nombre, esta proteína no interviene en el proceso de translocación nuclear de AHR [73].

### 1.3. Implicación fisiológica

En el pasado AHR fue considerado un receptor “huérfano” al carecer de un ligando endógeno conocido. Sin embargo, diversos hechos apoyan la relevancia funcional de AHR en la fisiología celular: (1) su presencia en la escala evolutiva mucho antes de la de compuestos policíclicos aromáticos en la atmósfera, (2) su expresión constitutiva en la mayoría de los tipos celulares, y (3) su grado de conservación entre diversos grupos de vertebrados tanto acuáticos como terrestres [118].

Su significancia también puede ser justificada debido a la evidencia de que diferentes moléculas generadas durante la homeostasis celular pueden activar su función [119]-[121]. En este sentido, se ha puesto de manifiesto que ciertos metabolitos interaccionan con AHR induciendo la transcripción de su gen diana *Cyp1a1*, como pueden ser:

- Metabolitos del triptófano y de otros compuestos con grupos indol [122], [123].
- Metabolitos del ácido araquidónico como la lipoxina A4 [124], [125].
- La bilirrubina [126].
- El 7-ceto-colesterol [127].
- Algunos flavonoides [128].
- Ciertas moléculas presentes en la orina como la indirrubina o el índigo [129].

## 1. RECEPTOR DE DIOXINA

---

Sin embargo, estas moléculas presentan en general características que los hace candidatos poco probables a ser reguladores endógenos de AHR en la mayoría de los tejidos: bajos niveles, poco potencial inductor y una distribución celular restringida. Dentro de este contexto, se ha propuesto que AHR pudiera haber evolucionado como parte de un sistema inducible encargado de metabolizar sustancias lipofílicas presentes en la dieta. Así los compuestos xenobióticos inducen cambios en proliferación y diferenciación de diversos tipos de células como probable resultado de la imitación o sustitución del efecto del ligando endógeno [130], [131]. Por tanto, las dioxinas podrían estar mimetizando la unión de esas moléculas endógenas al receptor.

Numerosas observaciones experimentales secundan el papel endógeno de AHR atendiendo a funciones celulares concretas en procesos fisiológicos y organogénicos:

- Su implicación en el desarrollo del hígado y del sistema vascular [132]-[134].
- Las alteraciones patológicas en los sistemas vascular, hepático, reproductivo e inmune que sufren los ratones carentes del receptor (*Ahr*<sup>-/-</sup>) [10]-[13], [135]-[138].
- La existencia de secuencias consenso XRE altamente conservadas y localizadas en regiones promotoras de genes con gran relevancia fisiológica [43], [112].
- Las alteraciones en la señalización mediada por TGF $\beta$  y ácido retinoico observadas *in vitro* en cultivos de fibroblastos embrionarios y en hepatocitos primarios e *in vivo* en hígado [20], [139]-[142].
- La interacción directa o indirecta en la regulación del ciclo celular y con otras rutas moleculares de señalización implicadas en proliferación [24], [121], [143]-[145].
- El control de la morfología celular, la adhesión y la migración en fibroblastos de ratón [50], [146] y en queratinocitos en proceso de transición

epitelio-mesénquima (*Epithelial-mesenchymal transition*, EMT) inducido por TGF $\beta$  [147].

- El incremento en migración epitelial y en cierre de heridas en ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> [146].
- La estimulación de la respuesta angiogénica por incremento de VEGF endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e inhibición del TGF $\beta$  estromal [148].
- La regulación de la expresión génica en procesos de EMT a través del control de la nueva familia de retrotransposones B1 por un mecanismo que implica a proteínas de la familia SNAIL [111], [149].
- La implicación de AHR en formación de un bucle de cromatina en el locus de *Nanog* durante la diferenciación de las células NTERA-2 humanas [38].
- La influencia de AHR en el desarrollo y la maduración de células germinales de testículos y ovarios [136] y en el desarrollo embrionario [40].
- El papel de AHR en la regulación de células madre implicadas en la regeneración pulmonar [150]; en la carcinogénesis y regeneración hepáticas [151]; y en la regeneración y homeostasis de la piel [152].

Un número creciente de estudios sugieren posibles nuevas rutas con las que AHR podría interaccionar. Las rutas más destacadas son las reguladas por el receptor de estrógenos ER $\alpha$  [44], [46], retinoblastoma pRb [143], la quinasa c-Src [48], HIF-1 $\alpha$  [153], y NF- $\kappa$ B [41]. Adicionalmente, diversos trabajos han propuesto que AHR puede participar en el control de la actividad de fosfatasa y quinasas aisladas de hepatocitos [154].

En cuanto a la relación entre AHR y el ciclo celular, el papel de este receptor es complejo, ya que AHR induce o reprime proliferación celular dependiendo del fenotipo de la célula diana (**Tabla 5**). Esta dualidad de acción se pone de manifiesto por ejemplo en el hecho de que la inhibición de AHR por un RNA interferente (*small interfering RNA*, siRNA) produce, tanto un aumento de la

## 1. RECEPTOR DE DIOXINA

---

proliferación de células de hepatoma humano HepG2, como una disminución del crecimiento de células tumorales de glándula mamaria humana MCF-7 [155]. De este modo, AHR puede desempeñar un papel tanto oncogénico como supresor tumoral en función del fenotipo de la célula diana de que se trate.

**Tabla 5: Papel dual de AHR en la proliferación de las células tumorales**

<b>Proteína oncogénica</b>	<b>Supresor tumoral</b>
Células de hepatoma deficientes en la expresión de AHR tienen un tiempo de replicación alargado por el bloqueo de la transición G1/S [120]	Ligandos de AHR disminuyen la proliferación de células de páncreas y de próstata [156], [157]
MEFs de ratón <i>Ahr</i> <sup>-/-</sup> presentan un mayor tiempo de duplicación [20]	Células 5L de hepatoma de rata sufren parada de ciclo celular en la transición G1/S tras la activación de AHR por xenobióticos [24], [27], [158]
AHR se encuentra sobre-activado en células T de leucemia adulta humana [159]	La expresión constitutiva de AHR induce apoptosis en células T Jurkat por bloqueo del ciclo celular en G1 [160]
La activación constitutiva de AHR incrementa la frecuencia de hepatocarcinogénesis en ratones transgénicos B6C3F1 [161]	La expresión de AHR se encuentra reprimida epigenéticamente por hipermetilación de su promotor en células de leucemia linfoblástica aguda y de leucemia mieloide crónica [162]
La depleción de AHR en células de cáncer de mama humanas altera la expresión de genes en rutas regulatorias claves en la progresión tumoral [163]	AHR reprime de manera constitutiva la expresión del oncogén <i>c-Myc</i> en líneas tumorales de glándula mamaria [30]

### Proteína oncogénica

---

AHR está sobre-expresado en meningiomas humanos [164]

La ausencia del receptor de dioxina acelera la regeneración del epitelio pulmonar [150]

### Supresor tumoral

---

La expresión de AHR en células de melanoma suprime el crecimiento tumoral y los niveles de AHR se encuentran significativamente reducidos en melanomas humanos [165]

La ausencia de AHR aumenta la progresión de tumores hepáticos inducidos por dietilnitrosamina (DEN) [151] o durante el envejecimiento [166], y en pulmón favorece el desarrollo de adenocarcinoma potenciando el efecto de la mutación K-RasG12D [167]

Todo lo expuesto anteriormente introduce el papel fisiológico del receptor AHR en diferentes órganos y patologías. En la presente Tesis Doctoral abordamos el papel de este receptor en dos procesos de elevada relevancia fisiológica. En el primer capítulo, estudiamos la implicación de AHR en la regeneración hepática, utilizando como modelo la hepatectomía parcial de 2/3 del hígado (HPx). En el segundo capítulo, investigamos el papel de AHR en la modulación del sistema inmune durante la esclerosis múltiple, empleando como modelo la Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE) con un enfoque clínicamente relevante para el desarrollo de tratamientos inmunomodulares.

## 1. RECEPTOR DE DIOXINA

---

# Capítulo 1

## Implicación del receptor de aril hidrocarburos Ahr en la regeneración hepática

### 1.1. Resumen I / Summary I

**Resumen I:** El hígado se encuentra entre los pocos órganos que tienen la capacidad de autorregenerarse en respuesta a un daño severo que comprometa su funcionalidad. El receptor de hidrocarburos de arilo (Ahr) es un factor de transcripción relevante para la desintoxicación de xenobióticos, pero también muy importante para el desarrollo y la homeostasis del hígado. Por lo tanto, Ahr modula la diferenciación de las células hepáticas a través de la expresión controlada de genes inductores de pluripotencia y células madre. En esta Tesis Doctoral, se utilizó como modelo la hepatectomía parcial (HPx) 2/3 con un enfoque clínicamente relevante para inducir la regeneración del hígado en ratones que expresan Ahr (*Ahr+/+*) y *Ahr-null* (*Ahr-/-*). La expresión y la actividad de Ahr se indujeron a tiempos cortos después de la HPx para acabar apagándose de

## 1.1. RESUMEN I / SUMMARY I

---

forma gradual durante la regeneración. Los ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> desencadenaron la regeneración del hígado mucho más rápidamente que los animales *Ahr*<sup>+/+</sup>, aunque ambos alcanzaron la regeneración completa en los últimos tiempos ensayados. En las etapas iniciales después de una HPx, los hígados *Ahr*<sup>-/-</sup> se regeneraron antes y mostraron una regulación positiva de los marcadores de proliferación celular y una mayor activación de las vías de señalización relacionadas con *stemness*, como las rutas Hippo-YAP y Wnt/ $\beta$ -catenina, junto con la inducción de citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IL6 y P65. Estos fenotipos, junto con la mejora de la adaptación metabólica de los ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> después de la HPx, probablemente podrían ser responsables de la expansión de células madre indiferenciadas que residen en el hígado y expresan OCT4, SOX2, KLF4 y NANOG. Proponemos que Ahr debe inducirse de forma temprana durante la regeneración para ajustar el nuevo crecimiento del hígado a niveles fisiológicos. Dado que la deficiencia de Ahr no resultó en un crecimiento excesivo del hígado, su inhibición farmacológica transitoria podría servir para mejorar la regeneración del hígado en pacientes hepatectomizados y trasplantados, y en aquellos expuestos a toxinas y carcinógenos dañinos para el hígado.



**Summary I:** The liver is among the few organs having the ability to self-regenerate in response to a severe damage compromising its functionality. The Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) is a transcription factor relevant for the detoxification of xenobiotics but also largely important for liver development and homeostasis. Hence, liver cell differentiation is modulated by Ahr through the controlled expression of pluripotency and stemness-inducing genes. Here, 2/3 partial hepatectomy (PH) was used as a clinically relevant approach to induce liver regeneration in Ahr-expressing (*Ahr+/+*) and Ahr-null (*Ahr-/-*) mice. Ahr expression and activity were early induced after 2/3 PH to be gradually downmodulated later during regeneration. *Ahr-/-* mice triggered liver regeneration much faster than *Ahr+/+* animals, although both reached full regeneration at the latest times assayed. At initial stages after PHx, earlier regenerating *Ahr-/-* livers had upregulation of cell proliferation markers and increased activation of signalling pathways related to stemness such as Hippo-YAP and Wnt/ $\beta$ -catenin, concomitantly with the induction of pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$ , IL6 and p65. These phenotypes, together with the improved metabolic adaptation of *Ahr-/-* mice after PH, could likely result from the expansion of undifferentiated stem cells residing in the liver expressing OCT4, SOX2, KLF4 and NANOG. We propose that Ahr needs to be induced early during regeneration to fine-tune liver regrowth to physiological values. Since Ahr deficiency did not result in liver overgrowth, its transient pharmacological inhibition could serve to improve liver regeneration in hepatectomized and transplanted patients and in those exposed to damaging liver toxins and carcinogens.

## 1.1. RESUMEN I / SUMMARY I

---

## **1.2. Introducción I**

### **1.2.1. El hígado**

El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano y solo es superado en complejidad por el cerebro. Se encuentra presente en la escala de vertebrados y es un órgano multifuncional vital siendo responsable del mantenimiento de la homeostasis sistémica, ya que es clave en la función digestiva y el metabolismo. Además, el hígado tiene otras funciones, incluida la generación de glóbulos rojos durante el desarrollo embrionario, la producción de diversas proteínas plasmáticas, la desintoxicación de xenobióticos y la fagocitosis de material sólido. También forma una barrera protectora entre el tracto digestivo y el resto del cuerpo. El hígado juega un papel fundamental en la activación, el catabolismo y la excreción de los retinoides, que son esenciales para la visión, el crecimiento, la reproducción, la inmunidad y la proliferación y diferenciación celular. Asimismo, la disfunción del hígado está involucrada en muchas enfermedades importantes, que causan una variedad de síntomas relacionados con problemas digestivos, niveles anormales de azúcar en la sangre, trastornos inmunológicos, absorción anormal de grasas y problemas metabólicos. Igualmente, como es el órgano principal para la eliminación de fármacos, tiene un efecto significativo en el metabolismo de los mismos [168], [169].

La función fisiológica del hígado en humanos, ratones y ratas es similar, como consecuencia de un patrón de expresión génica similar. Especialmente en hígado de ratón y rata, más del 88 % de los genes muestran niveles de expresión compartidos. Los cambios de expresión entre las diferentes especies corresponden a una serie de genes homólogos diferencialmente expresados. Por tanto, en su mayor parte, el hígado de estos roedores recapitula fielmente la estructura y función del órgano humano.

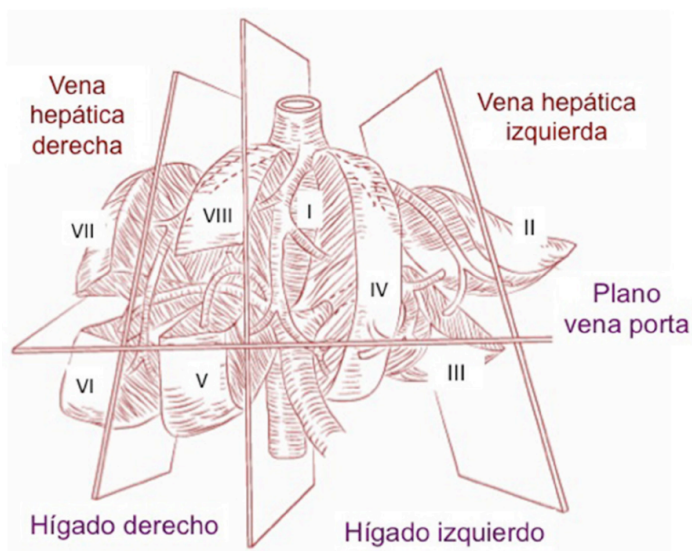
#### **1.2.1.1. Estructura anatómica**

En la especie humana el hígado es un órgano macizo que representa aproximadamente el 2 % de peso de un individuo sano adulto, con ligeras diferencias

## 1.2. INTRODUCCIÓN I

---

entre sexes. Externamente, el hígado está dividido por el ligamento falciforme en un gran lóbulo derecho y otro izquierdo, algo más pequeño. El conocimiento de la anatomía del hígado no ha experimentado variaciones a lo largo del tiempo, pero su interpretación ha ido evolucionando de forma paralela al desarrollo de los métodos de diagnóstico por imagen, y a los avances en la cirugía de resección (hepatectomías). Así, en 1954, Claude Couinaud, describió una segmentación hepática basándose en la bifurcación de las ramas portales y de las venas suprahepáticas [170]. Posteriormente en 1957, Goldsmith y Woodburn introdujeron una nueva terminología distinguiendo una serie de planos para las hepatectomías [171]. Con el objeto de poder unificar los criterios de las diferentes terminologías, el Comité de Terminología de la IHPBA (Asociación Internacional Hepato-Pancreato-Biliar) se reunió en el año 2000, para proponer una nueva terminología universal [172] que aparece ilustrada en la **Figura 1.1**.



**Figura 1.1:** Los segmentos anatómicos del hígado se delimitan por la distribución de los sistemas venoso hepático y portal: sección anterior derecha (V y VIII), sección posterior derecha (VI y VII), sección medial izquierda (IV) y sección lateral izquierda (II y III) [172], [173].

La anatomía del hígado de la rata y el ratón difiere de la humana, pero entre ellos es semejante (**Figura 1.2**). Siguiendo la descripción de Higgins y Anderson, se pueden distinguir cuatro lóbulos principales: el lóbulo mediano, el lóbulo lateral izquierdo (la suma de ambos supone el 70 % de la masa hepática), el lóbulo lateral derecho y el lóbulo caudado. El lóbulo mediano está dividido en dos lóbulos centrales: derecho e izquierdo. El lóbulo lateral derecho, a su vez, se encuentra hendido transversalmente por una cisura que lo divide en dos lóbulos menores. El lóbulo lateral izquierdo es un lóbulo grande y sin cisuras. El lóbulo caudado está dividido en dos lóbulos menores. La cápsula conectiva reviste todo el órgano y se refleja (adhiriéndose a ellos) en los órganos y estructuras vecinas: diafragma, estómago, esófago, riñón derecho y vena cava suprahepática [174], [175].

El peso medio del hígado de estos roedores puede variar, pero por lo general en ratones es de 2-3 g (3-5 % del peso corporal) y en ratas de 4-5 g (2-3 % de peso corporal) [176].

### 1.2.1.2. Histología hepática: células y circulación del hígado

La célula principal del hígado es el hepatocito, al que acompañan otras células que completan la composición celular del hígado [177] (**Figura 1.3B**):

- **Hepatocitos:** son las células parenquimatosas del hígado y representan las células funcionalmente más activas del órgano. Su forma celular es poliédrica con 1 ó 2 núcleos esféricos poliploides y un nucléolo prominente. Presentan el citoplasma acidófilo con cuerpos basófilos, muy rico en orgánulos relacionados con sus funciones e inclusiones de glucógeno y de grasa. Su membrana plasmática por el dominio sinusoidal se orienta hacia el espacio de *Disse* y por el dominio lateral hacia el hepatocito vecino.
- **Células de *Kupffer*:** son macrófagos fijos pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear. Su principal función es eliminar mediante el proceso de fagocitosis todo tipo de partículas extrañas, incluyendo eritrocitos envejecidos y bacterias.

## 1.2. INTRODUCCIÓN I

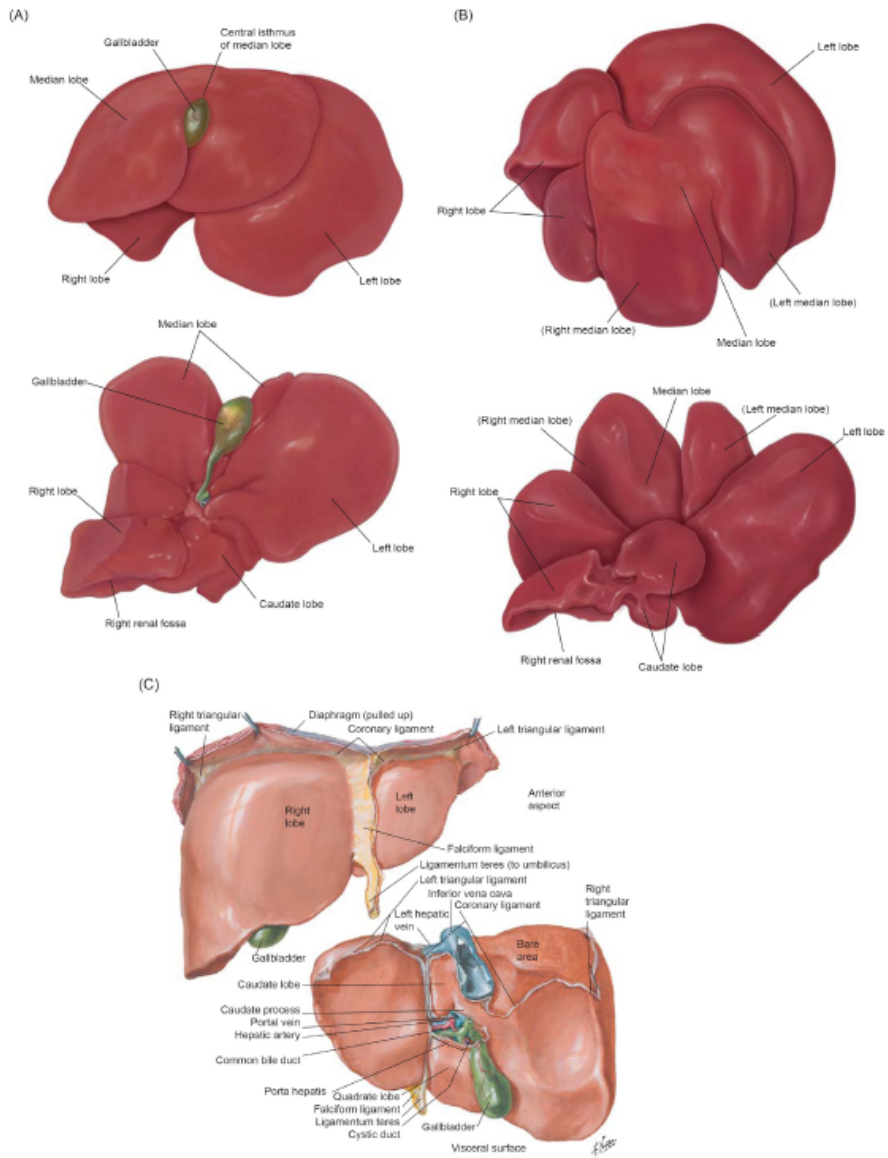


Figura 1.2: Anatomía macroscópica del hígado y la vesícula biliar. (A) Ratón, (B) rata y (C) humano [176].

- **Células endoteliales:** tapizan la luz de los sinusoides, tienen un citoplasma fenestrado a través del cual penetran los componentes de la sangre en dirección a la membrana sinusoidal de los hepatocitos.
- **Células hepáticas estrelladas o de Ito:** poseen la capacidad de almacenar lípidos y vitamina A, constituyendo su principal reserva en el organismo. Se localizan en el espacio de *Disse* y pueden producir importantes cantidades de colágeno en respuesta a estímulos inflamatorios.
- **Células de Pit:** son células linfoides residentes en el hígado similares a las células *Natural Killer* (NK) con capacidad citotóxica.
- **Células ductales o colangiocitos** (*Biliary epithelial cells*, BECs): forman la pared de los pequeños ductos por los que circula la bilis.

La unidad funcional y estructural del hígado es el lobulillo hepático, en cuyo centro se localiza una vena centrolobulillar y en las esquinas los espacios porta, constituidos por una rama venosa portal, una rama de la arteria hepática y un conducto biliar (**Figura 1.3**). Cada lobulillo tiene forma hexagonal. Entre las esquinas del hexágono y el centro del lobulillo se encuentran los sinusoides hepáticos y los hepatocitos, que se disponen en forma de cordones radiados desde la vena centrolobulillar hasta la periferia del lobulillo. Estos cordones están separados entre sí por los sinusoides hepáticos, un tipo especial de capilar con amplios poros intercelulares por los que pueden pasar elementos sanguíneos de alto peso molecular y que, al igual que los cordones de hepatocitos, se disponen de forma radial desde la vena centrolobulillar.

La bilis es secretada por los hepatocitos hacia los conductillos biliares revestidos por un epitelio simple cuboidal (epitelio biliar). El canal de Hering es la conexión que existe entre los canalículos biliares y el conducto biliar a nivel de la interfase lobulillo-espacio porta.

Una de las características únicas hepáticas es el flujo sanguíneo doble:

- **Flujo trófico:** dependiente de la ramificación de la arteria hepática y transporta sangre oxigenada.

## 1.2. INTRODUCCIÓN I

---

- **Flujo funcional:** dependiente de la vena porta y transporta sangre poco oxigenada y rica en nutrientes proveniente del tracto gastrointestinal y del bazo.

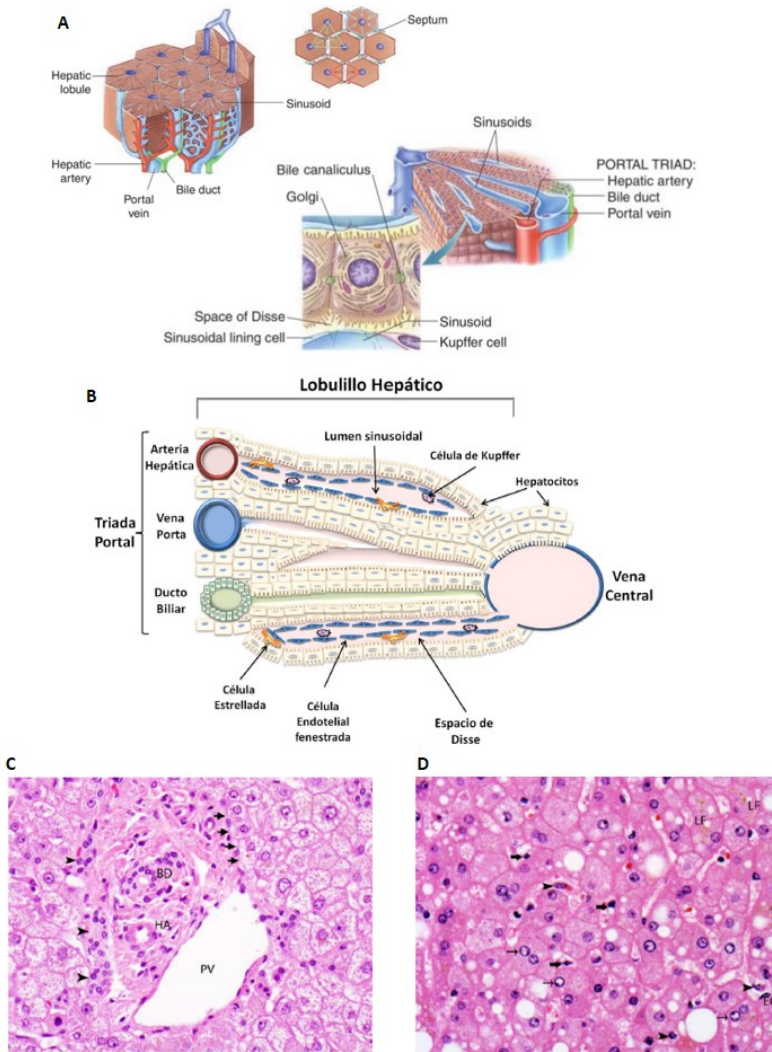
Ambos flujos convergen a nivel centrolobulillar, dirigiéndose hacia los espacios porta a través de los sinusoides, que filtran la sangre de todas las sustancias que pueda contener y que puedan ser procesadas por los hepatocitos. Finalmente abandona el hígado a través de las ramificaciones de la vena hepática, también llamadas suprahepáticas, que finalmente drenan en la vena cava inferior (**Figura 1.3**).

El hígado recibe el flujo sanguíneo desde el intestino, desde donde llegan varios tipos de sustancias, incluyendo toxinas, drogas y xenobióticos. Por este motivo, puede ser considerado la barrera o filtro primario del cuerpo y está inherentemente sujeto a daños causados por estos compuestos. Además, es susceptible de ser atacado por varios tipos de virus que provocan lesiones agudas o crónicas. No obstante, para responder a estas agresiones, el hígado presenta una notable plasticidad después de una lesión siendo el único órgano adulto con un potencial regenerativo completo que le permite restablecer su estructura y ejercer adecuadamente sus funciones tras sufrir un daño.

### 1.2.1.3. Fenotipo hepático de los ratones *knock-out* para *Ahr*

Como se mencionó anteriormente, AHR juega un papel relevante en procesos fisiológicos y organogénicos. Entre los hallazgos descritos, uno de los fenotipos mejor caracterizados, y que más apoyo proporciona al papel de AHR en la homeostasis celular, es la aparición de una marcada patología hepática tras la inactivación génica del receptor (**Figura 1.4**). El hígado de los ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> es de aproximadamente la mitad de tamaño que el de los ratones silvestres [181]. Adicionalmente, el hígado *Ahr*<sup>-/-</sup> presenta acumulación de colágeno que resulta en fibrosis hepática alrededor de las triadas portales [12], [141], [182]. Interesantemente, esta fibrosis portal co-localiza con un incremento de expresión tanto de TGF $\beta$  como de su proteína de localización en la matriz extracelular LTBP-1 [141], [183]. Además, este fenotipo hepático se caracteriza por presentar mayor





**Figura 1.3: Estructura del lobulillo hepático:** (A) en corte transversal y (B) distal [178] . Hematoxilina-eosina hepática [179]: (C) Conducto biliar (BD), arteria hepática (HA), vena porta (PV), conductillos biliares (puntas de flecha) y espacio porta (flechas). (D) Células endoteliales (EC), de Kupffer (puntas de flecha), estrelladas (flechas gruesas), núcleos glucogenados claros (flechas finas), pigmento de lipofuscina (LF) y esteatosis (puntos blancos).

## 1.2. INTRODUCCIÓN I

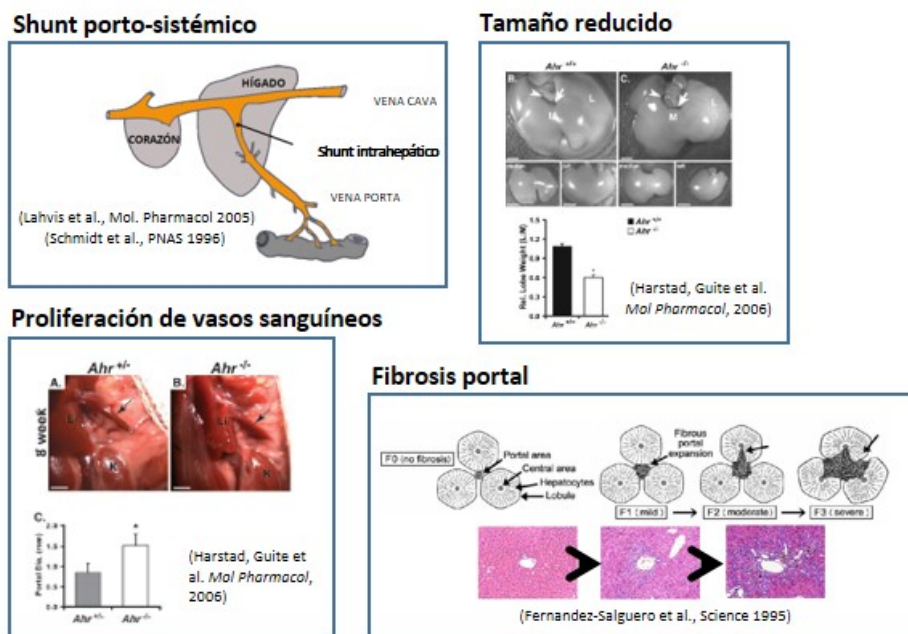


Figura 1.4: Fenotipo hepático de los ratones  $Ahr^{-/-}$  comparado con el de ratones silvestres [12], [134], [180], [181].

proliferación de vasos sanguíneos en la zona portal y en ciertas áreas del parénquima [13], así como con una falta de resolución de la conexión porto-sistémica en ratones adultos (Figura 1.4) [15], [180], [181].

Recientemente, se ha descubierto la implicación de *Ahr* en el proceso de diferenciación que tiene lugar durante la maduración hepática [133]. La transición de un estado diploide en neonatos (*preweaning*) hasta un estado poliploide en el hígado de individuos adultos, requiere la modificación del ciclo celular para inhibir la división [184]-[186]. De forma que, la deficiencia de *Ahr* aumenta la celularidad y reduce el tamaño celular promedio en el hígado proliferativo antes del destete y, sorprendentemente, este fenotipo hiperproliferativo, en lugar de ser bloqueado como en ratones adultos de tipo silvestre para *Ahr*, se mantuvo en el hígado  $Ahr^{-/-}$  adulto. Por tanto, *Ahr* juega un papel de elevada relevancia manteniendo niveles fisiológicos de activación de las vías de señalización que controlan

proliferación, diferenciación y el metabolismo del hígado en el proceso de poliploidización hepática. Este hecho se apoya en estudios previos que demuestran que Ahr impide la progresión mitótica e induce la diferenciación, además de prevenir la pluripotencia en diferentes tipos de células [38], [39], [162], [187]-[189].

La marcada importancia que tiene el balance entre diferenciación y pluripotencia en el desarrollo de numerosas patologías, impulsó a la comunidad científica a dilucidar el papel de AHR en la regulación de estos procesos. Análisis de genoma completo tras inmunoprecipitación de cromatina (*Chromatin Immunoprecipitation*, ChIP) (*Genome-wide ChIP*) de células de carcinoma hepatocelular procedentes de ratones silvestres y *Ahr*<sup>-/-</sup>, permitieron identificar varios grupos de genes implicados en diferenciación celular y desarrollo regulados directamente por Ahr en ausencia de ligando exógeno [190]. Así diversos estudios han confirmado que la deficiencia de Ahr aumenta la susceptibilidad al desarrollo de hepatocarcinoma, reduciendo la supervivencia de una fracción significativa de ratones [151], [191]. Sin embargo, en muestras de hepatocarcinoma humano el receptor muestra un patrón de expresión opuesto al observado en ratón, ya que en el modelo murino su expresión era predominante en la fracción no tumoral mientras que en humano lo era en la fracción tumoral [151]. Existen también evidencias *in vivo* e *in vitro* del papel de AHR en hepatocarcinogénesis, pues se ha demostrado que el hexaclorobenceno (HCB) induce la expresión de AHR en focos preneoplásicos de hígado de rata y en células de hepatocarcinoma humano HepG2 [192].

Pero el hecho de que los ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> muestren un fenotipo hepático más indiferenciado y, en definitiva, un estado basal más pluripotente, podría tener como consecuencia una capacidad regenerativa más efectiva. Usando diferentes modelos murinos de regeneración en el hígado, se ha confirmado la implicación de AHR en este proceso. Así la presencia de TCDD inhibe la regeneración hepática en ratón después de la hepatectomía parcial del hígado [193], [194] y la deficiencia de Ahr mejora la regeneración hepática después de un daño tóxico agudo [151].

## 1.2. INTRODUCCIÓN I

---

### 1.2.2. La regeneración hepática

La regeneración tisular es un complejo proceso que tiene como fin último restaurar y/o reemplazar un órgano o tejido dañado, después de lesiones o procesos patológicos de diversa índole. Sin embargo, algunos tejidos tienen altas tasas de regeneración a lo largo de la vida en condiciones normofisiológicas. Esta capacidad difiere entre especies, e incluso en los tejidos de un mismo organismo [195]: en especies no mamíferas es tan efectiva que se pueden regenerar organismos completos a partir de pequeños fragmentos corporales [196], y en las especies de mamíferos, la regeneración de tejidos se restringe solo a algunos órganos, incluidos el músculo esquelético, el hígado, el epitelio intestinal, la piel y la sangre [197]-[200].

La primera alusión histórica de regeneración hepática la encontramos en la antigua Grecia con el mito de Prometeo: Zeus castigó a Prometeo encadenándolo a la cima del monte Cáucaso, donde cada mañana un águila le devoraba el hígado, regenerándose éste durante la noche. En 1931, Higgins y Anderson desarrollaron el primer modelo de regeneración hepática en ratas a las que se les practicó una hepatectomía del 70 % del órgano [174]. En 1953, Child *et al.* realizaron un estudio en perros, estableciendo que la cantidad del flujo sanguíneo hepático total era el principal determinante para la regeneración del hígado [201]. Posteriormente, Starzl *et al.* demostraron en otro modelo en perros que la infusión de insulina en la vena porta izquierda reducía la atrofia del hígado conservando la ultraestructura de los hepatocitos y triplicando la renovación celular [202], [203]. Así, gracias al desarrollo de nuevos modelos experimentales en animales, la investigación de la regeneración hepática ha permitido estudiar numerosos factores extrínsecos de crecimiento hepático, cambios intrínsecos en la matriz extracelular, así como mecanismos de transducción de señales intracelulares que están presentes en el hígado y que forman parte del entramado necesario para que la regeneración tenga lugar [204]-[207].

### 1.2.2.1. Hepatectomía parcial

La rápida capacidad de regeneración del hígado continúa fascinando a los investigadores y no es igualada por ningún proceso regenerativo en otro órgano en los mamíferos. Este proceso se puede inducir mediante diversos procedimientos en varios modelos animales (ratón, rata, cerdo o perro), siendo el preferente la resección quirúrgica de una parte sustancial del hígado en roedores. En la regeneración de la cola u otros miembros en la familia de los anfibios se consigue restaurar la estructura anatómica original [208]. Sin embargo, tras una hepatectomía parcial (HPx), el hígado puede volver a alcanzar aproximadamente su peso anterior, aunque nunca reproduce la misma estructura anatómica. Esto se debe a que los lóbulos remanentes tras la cirugía aumentan de peso y tamaño, pero los lóbulos extirpados no vuelven a formarse [203]. Así, la regeneración se debe a una hipertrofia de las células restantes seguida de su hiperplasia, más que a un proceso regenerativo *per se*. A pesar de ello, el término de regeneración hepática ha sido completamente aceptado por la comunidad científica.

### 1.2.2.2. Fases de la regeneración hepática

La regeneración del hígado se logra primordialmente a la acción coordinada de citocinas, factores de crecimiento (*Growth Factor*, GF) y señales metabólicas. Es tal la redundancia entre sus componentes intracelulares que rara vez el silenciamiento de un gen impide totalmente este proceso [209]. Se pueden diferenciar una serie de etapas secuenciales y superpuestas en el proceso regenerativo (**Figura 1.5**):

**a. Fase de cebado** (*“priming phase”*): en el hígado diferenciado y maduro los hepatocitos, los hepatocitos se encuentran en estado quiescente no proliferativo (fase G0) para lograr la estabilidad fenotípica. En este estado, los hepatocitos no responden a los factores de crecimiento y necesitan ser estimulados antes de entrar en el ciclo celular. Las células de *Kupffer* (macrófagos del hígado) liberan citoquinas como  $\text{TNF}\alpha$  e IL-6 (Interleukin-6) [210].  $\text{TNF}\alpha$  activa la señalización de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , y a su vez, la IL-6 activa la señalización mediada por STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*). Esto provoca la inducción de ge-

## 1.2. INTRODUCCIÓN I

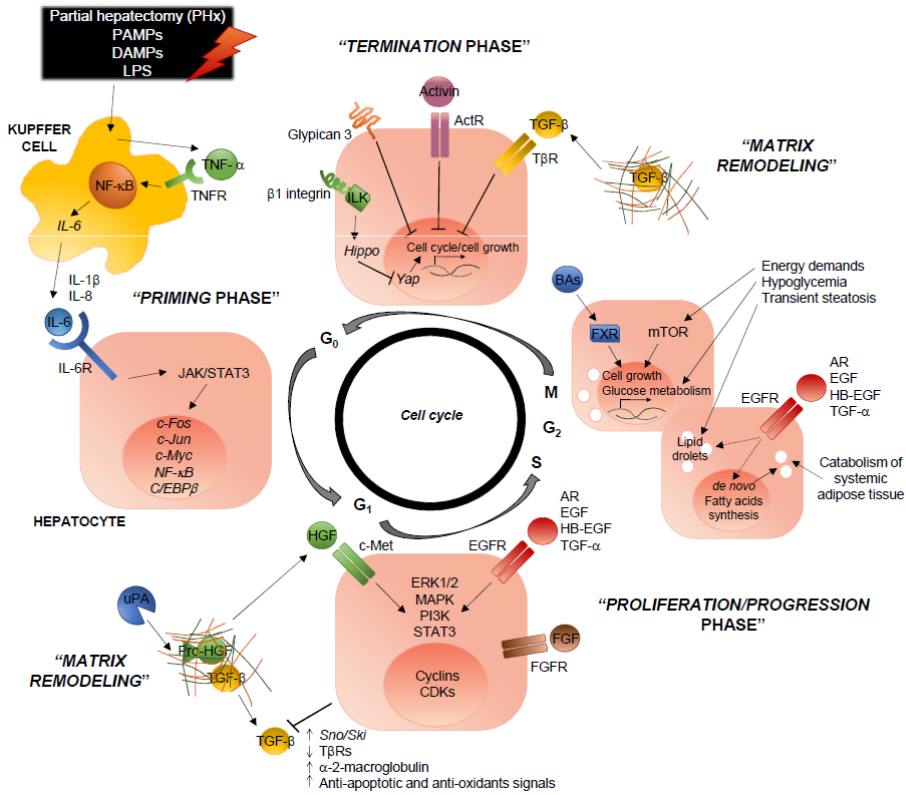


Figura 1.5: Las cuatro fases de la regeneración hepática basada en la proliferación celular [209].

nes inmediatos-tempranos relacionados con la proliferación de hepatocitos como *c-Fos*, *c-Jun* y otros [206], [211], [212]. Aunque estas citoquinas no son directamente mitogénicas para los hepatocitos, son cruciales para orquestar y optimizar el proceso: se observa un retraso de la regeneración en ratones *Tnfr1*<sup>-/-</sup> debido a la activación ineficiente de NF- $\kappa$ B [213] y en ratones *Il6*<sup>-/-</sup> debido a la pérdida de activación de STAT3 [210]. Otros factores implicados son también liberados desde el páncreas (insulina), el duodeno (*Epidermal growth factor*, EGF), la glándula adrenal (noradrenalina), el tiroides (triyodotironina, T3) y las células estrelladas (*Hepatocyte growth factor*, HGF). La cooperación entre todas estas señales,

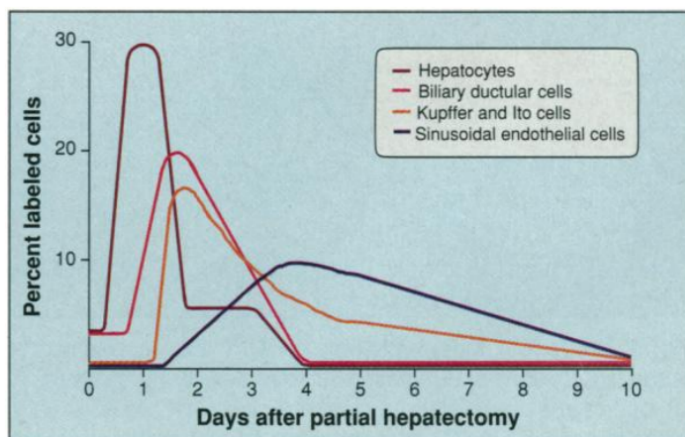


Figura 1.6: Cinética temporal de la síntesis de ADN en diferentes tipos de células hepáticas durante la regeneración del hígado después de una hepatectomía parcial [217].

permite a los hepatocitos entrar en el ciclo celular [214].

**b. Fase proliferación/progresión** (*“Proliferation/progression phase”*): Después de que las citocinas hayan desbloqueado la transición G0/G1, los hepatocitos entran en fase S (síntesis de ADN) y continúan el ciclo celular hasta lograr su división mitótica. Estudios con hepatocitos marcados con timidina, demostraron que se dividen 1-2 veces hasta que consiguen restaurar el número original de células en 3-4 días [215]. El pico máximo de regeneración difiere entre las especies: en la rata se produce a las 24 horas [216]; en el ratón a las 48 horas [217]; en el perro [218] y el cerdo a las 72 horas [219]; y en humanos, no está totalmente establecido, aunque se apunta a un inicio del proceso regenerativo tras 24 horas y una lenta progresión durante tres semanas [220]. El porcentaje de hepatocitos que entran en ciclo celular no es un valor fijo, ya que depende de la edad del individuo y del tipo e intensidad del estímulo proliferativo [221]. Del mismo modo que los hepatocitos, el resto de células también se dividen con el objeto de restaurar el número de células original durante los primeros 7 días [215], [217] (**Figura 1.6**).

Además, tras la PHx se producen otros cambios relacionados con el meta-

## 1.2. INTRODUCCIÓN I

---

bolismo hepático; concretamente en las fases tempranas de la regeneración los hepatocitos potencian el metabolismo lipídico generándose una esteatosis transitoria, frente al detrimento del metabolismo glucolítico [222]-[224]. El catabolismo lipídico se origina debido a que el hígado tiene que continuar regulando los niveles de energía sistémica mientras satisface sus propias demandas de síntesis de nucleótidos y proteínas necesarias para la división celular. En cuanto al metabolismo de la glucosa, los ratones desarrollan hipoglucemia poco después de la PHx, mostrando niveles reducidos de insulina. Finalmente, el metabolismo de los ácidos biliares también se ve alterado, aumentando al doble sus cantidades por masa hepática sin presentar hepatotoxicidad [225].

**c. Fase de terminación:** El estallido inicial de actividad proliferativa de hepatocitos es seguido por ondas secundarias de mitosis hasta que se restablece la masa hepática original. Sin embargo, se debe terminar el crecimiento para controlar el tamaño y la homeostasis hepática, aunque los mecanismos precisos de un punto y final adecuado aún son poco conocidos e incluso controvertidos. Generalmente, cuando el hígado en proceso de regeneración alcanza cierto tamaño, varios factores promueven la detención de la proliferación. Sorprendentemente, muchos de ellos también están presentes en las primeras etapas.

Se ha propuesto que estos factores actuarían como un “freno”, controlando la velocidad de proliferación y siendo responsables de finalizar el proceso, e incluso asegurando la dirección correcta, impidiendo el desarrollo tumoral por una proliferación celular descontrolada. Se sabe que involucra múltiples factores, incluyendo la familia  $TGF\beta$  ( $TGF\beta 1$  (*Transforming growth factor beta-1*), activinas), IL-1 y genes supresores de tumores (p53, p21) [206], [226].

**d. Fase de remodelación:** La reorganización de los componentes de la matriz extracelular (*extracellular matrix*, ECM) es fundamental para iniciar la proliferación celular en las primeras etapas de la regeneración del hígado. Tras la HPx, uno de los primeros cambios es el aumento de la actividad del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (*urokinase-type plasminogen activator*, uPA), la cual media en la remodelación de ECM mediante la activación de metaloproteinasas (*Matrix metalloproteinases*, MMP), como MMP-2 y MMP-9 [227], y del factor de crecimiento de hepatocitos HGF, el cuál es activado por uPA y liberado



al torrente sanguíneo. Así la deficiencia de uPA retrasa la regeneración [228].

### 1.2.2.3. Rol de las células progenitoras hepáticas en la regeneración

Cuando el hígado sufre un daño severo o la proliferación de hepatocitos maduros es insuficiente para restaurar el tejido, la activación de las células madre/progenitoras del hígado (*liver stem/progenitor cells*, LS/PC) es crucial para lograr el éxito de la regeneración. Esto se ha observado en modelos que combinan HPx con inhibición química de la proliferación de hepatocitos [226]. Si bien existe cierta controversia acerca de la contribución de estas células en la regeneración tras la HPx, aunque algunos estudios sugieren que éstas juegan un rol importante en el mismo participando y expandiéndose durante el proceso [229]-[231].

Las células parenquimatosas y no parenquimatosas en el hígado, la remodelación de la matriz extracelular, los factores de transcripción, las señales y células inflamatorias, y multitud de vías de señalización reguladas durante la regeneración participan contribuyendo al nicho de LS/PC. Por ejemplo, se requiere la activación de NF- $\kappa$ B y STAT3 en células ovales de rata para su activación, expansión y diferenciación [232], y es totalmente obvio que el microambiente inflamatorio regula la expansión y el destino de las células progenitoras del hígado [233]. Es importante destacar que esta respuesta se observa en hepatocitos humanos, los cuáles adquieren un fenotipo de célula madre. Curiosamente, este es un proceso reversible, en el que las células madre mesenquimales pueden volver a diferenciarse en hepatocitos, lo que abre posibilidades viables para tratar enfermedades hepáticas humanas [234].

Pero no sólo los LS/PC residentes juegan un papel en la regeneración del hígado. Hoy en día, también existe el consenso de que las células madre de sitios extrahepáticos, mayoritariamente las procedentes de la médula ósea, pueden participar y contribuir a la regeneración [235], [236], aunque con baja eficiencia. Las células madre hematopoyéticas y mesenquimales se encuentran entre las mejor definidas y migran al hígado lesionado a través de la circulación para regenerar el órgano.

Por todo ello, las células progenitoras pueden ser una alternativa atractiva al trasplante de órganos debido a que pueden expandirse en cultivo sin perder el

## 1.2. INTRODUCCIÓN I

---

potencial de diferenciación bidireccional. De este modo, el aislamiento de LS/PC de un paciente obviaría la necesidad de la inmunosupresión [237]. Se han propuesto varios candidatos alternativos a los trasplantes de hígado basados en el concepto de células progenitoras, y, más recientemente, en las células madre pluripotentes inducidas (*induced pluripotent stem cells*, iPSC). La atractiva capacidad de derivar células pluripotentes a partir de tejidos humanos adultos abre nuevas oportunidades en la investigación y, lo que es más importante, en la terapia. Un estudio confirmó que los hepatocitos derivados de iPSC poseían las capacidades funcionales y proliferativas necesarias para la regeneración del hígado *in vivo* en ratones [238]. Este proceso puede inducirse regulando las condiciones que definen el desarrollo del hígado embrionario [239]. Más tarde, Takebe y colaboradores llevaron a cabo un gran logro con la formación de un hígado humano vascularizado y funcional después del trasplante de células hepáticas creadas *in vitro* derivadas de iPSC [240].

La respuesta de LS/PC incluye activación, proliferación, migración y diferenciación, dando lugar finalmente a hepatocitos o colangiocitos. Para ello existe una regulación positiva de rutas como:

**a. Ruta Wnt/ $\beta$ catenina:** La proteína  $\beta$ -catenina es un integrador clave en la interacción célula-célula mediada por E-Cadherina, así como de la regulación transcripcional que se produce a través de esta ruta. Esta ruta desempeña papeles críticos en la regulación de células progenitoras en muchos tejidos y órganos, incluido el hígado. La ruta Wnt dirige las LS/PC hacia el destino hepatocítico [241]. En condiciones de lesión hepática en las que se induce la expansión de LS/PC en ratas, ratones y humanos, se ha observado la inducción de varios genes de la familia Wnt [242]-[245]. Así ante estas situaciones de daño hepático, puede participar en la regeneración una población de hepatocitos recientemente descubierta. Esta población de células generalmente se caracteriza por presentar capacidad de autorrenovación, localizarse adyacente a la vena central, ser diploide y expresar *Axin2*, el gen diana de la ruta Wnt canónico. Además estas células indiferenciadas serían las encargadas de proporcionar, dependiendo de las necesidades, señales Wnt que mantendrían esta población, constituyendo así un “nicho de células madre” [246].

**b. Ruta Hippo/YAP:** Esta ruta constituye una cascada de quinasas implicadas en la regulación del número de células durante el desarrollo y en la homeostasis de tejidos a través del control de la proliferación, diferenciación y muerte celular controlando el tamaño y forma de los órganos [247]-[249]. También es crucial para la renovación de las células madre y para el mantenimiento de la estabilidad genómica. YAP es el principal efector de esta vía de señalización actuando como un coactivador transcripcional, el cual se localiza en el núcleo cuando está hipofosforilado con el fin de activar la expresión de sus genes diana. En el hígado, se ha demostrado que una proteína ligada a la membrana plasmática de los hepatocitos, Glypican 3, suprime la proliferación después de HPx cuando se sobreexpresa en animales transgénicos, lo que correlaciona con una expresión disminuida de YAP controlando el tamaño celular y el hepatoblasto [250]. Otro estudio reveló que una activación ectópica de YAP en hepatocitos provoca su dediferenciación adquiriendo características de células progenitoras [251].

### 1.2.2.4. Papel de AHR en la regeneración tisular

En regeneración se ha demostrado que algunos factores de transcripción pueden controlar los diferentes tipos y respuestas celulares. Es bien conocido el revelador descubrimiento del científico Yamanaka, el cual demostró que la introducción de cuatro factores de transcripción (OCT4, SOX2, KLF4 y MYC), pueden actuar en conjunto para revertir fibroblastos diferenciados en células madre pluripotentes con características similares a las células madre embrionarias [252].

Como se ha mencionado anteriormente, AHR es otro factor de transcripción involucrado en una gran variedad de funciones fisiológicas [162], [253]. Recientemente, se ha relacionado AHR con algunos de los factores de Yamanaka en la regulación de la pluripotencia y el estado de diferenciación en diferentes contextos como la diferenciación de las células de carcinoma embrionario humano [38], [39] y en la embriogénesis temprana de ratones [40]. Otros trabajos sugieren que AHR puede tener un papel causal en el mantenimiento de la diferenciación del sistema inmunológico [188], [254], de las gónadas [136], en melanoma [165], [187] y en la piel [147]. Cabe destacar que existen evidencias de que la activación de los programas genéticos involucrados en la embriogénesis son críticos y dominantes

## 1.2. INTRODUCCIÓN I

---

en la regeneración [255]-[257]. De esta forma, en estudios de regeneración se ha demostrado que AHR está implicado en la regulación de marcadores de pluripotencia (REVISIÓN) como OCT4 y NANOG en órganos como el pulmón [150] y el hígado [151] tras daño tóxico agudo en roedores, y en diferentes líneas celulares [189], [258].

Estudios recientes han asociado la activación de estos factores de pluripotencia con la expansión y activación de células con fenotipo de célula madre (“*stem cell*”) [259]-[261]. Un ejemplo lo encontramos con los factores SOX2 y KLF4, los cuales son fundamentales en una población de células madre ubicadas en el epitelio olfativo y entre las neuronas ganglionares de la retina responsable del proceso de regeneración en estos órganos [262], [263]. La expresión de AHR parece también relevante en la funcionalidad de células madre embrionarias [189], [264], osteoblastos [265], [266] y células de teratocarcinoma embrionario humano [38], [39]. Por tanto, AHR también afecta la capacidad “*stemness*” (capacidad de una célula madre para auto-renovarse o diferenciarse) en diferentes entornos:

- Su activación impide la diferenciación de células madre derivadas de la médula ósea en osteoblastos [267].
- Su carencia en ratones *Ahr-null* aumenta la población de células con fenotipo *stem* en la reparación de pulmón e hígado [150], [151].
- La activación de AHR en células madre/progenitoras hematopoyéticas afecta la proliferación, el tráfico y la migración celular [268]-[270].
- Los pulmones con mutación en K-Ras carentes del receptor (*KRasG12DAhr-/-*) contienen un mayor número de células que expresan marcadores tanto para células progenitoras Clara como alveolares de tipo II, y también tienen un mayor número de células positivas para marcadores de células madre pluripotentes [167].
- La ausencia de AHR afecta a la población de células progenitoras encargadas de la regeneración de la piel [152].

Además, AHR actúa como un regulador principal de vías de señalización positivamente relacionadas con las células madre como la vía Hippo/YAP y la vía Wnt/ $\beta$ -catenina [40], [133], [271].

No obstante, se requiere la proliferación de poblaciones no solo de células madre para garantizar la restauración del tejido dañado. Estudios independientes han demostrado que las dianas transcripcionales del grupo II de AHR incluyen genes implicados en el control de la proliferación. De este modo, AHR participa como modulador del ciclo celular a través de la regulación de la progresión de la fase G1/S. TCDD puede afectar la regeneración del hígado después de HPx al controlar los niveles de los inhibidores de ciclina quinasa p21Cip1 y p27Kip1 [193]. Del mismo modo, los tratamientos con ligandos de AHR producen su activación sostenida lo que conlleva la detención del ciclo celular en G1 en células 5L [272]-[274], Hepa-1c1c7 [89] y MCF7 [275]. La inducción de su diana transcripcional, *Cyp1a1*, es un mecanismo de retroalimentación negativa para eliminar ligandos AHR endógenos con el fin de asegurar una correcta proliferación celular [276]. Otros estudios han demostrado que AHR forma complejos con la proteína RB [158], [277], [278], actuando como regulador negativo de la progresión del ciclo celular al inhibir la actividad transcripcional dependiente de E2F.

La entrada en el ciclo celular puede estar relacionada con una inflamación aguda mediada por el sistema inmune innato. La importancia de AHR en la regulación del sistema inmune comienza a emerger, como muestran estudios recientes que describen la limitación de las respuestas de los macrófagos a estímulos inflamatorios dependientes de la activación de AHR [254]. La formación de complejos AHR-RelA también puede ayudar a explicar algunos de los resultados toxicológicos adversos de los ligandos AHR, como la inmunosupresión, la involución tímica, la hiperqueratosis y la carcinogénesis [279]. En consecuencia, en ratones de edad avanzada, AHR regula transcripcionalmente la expresión de los genes relacionados con la senescencia, *p16Ink4a*, *p21Cip1* y *Tnf $\alpha$* . Además, los ratones envejecidos que carecen de expresión de AHR muestran niveles más altos de inflamación y expresión de estos marcadores de senescencia [166].

Numerosos estudios en diferentes modelos de mamíferos avalan la implicación directa de AHR en la regeneración celular mediante la modulación de diferen-

## 1.2. INTRODUCCIÓN I

---

tes vías de señalización esenciales en este proceso. La activación de AHR inhibe el crecimiento regenerativo de hepatocitos después de una hepatectomía parcial, lo que da como resultado la expresión de p21Cip1 en ratones [193], [194] y la regulación mediada por AHR de la progresión del ciclo celular en ratas hepatectomizadas [280]. AHR tiene una implicación principal en la enfermedad ósea, particularmente en el papel de los contaminantes ambientales responsables de la pérdida ósea, por ejemplo: AHR participa en la remodelación ósea al alterar la interacción entre los osteoblastos que forman hueso y los osteoclastos que reabsorben hueso en células de osteosarcoma humano [281]; inhibe la diferenciación osteogénica en células de osteoblastos humanos [282]; y la inhibición de AHR conduce a un aumento en la densidad mineral ósea (DMO) y dureza ósea en modelos murinos [266].

En otro modelo animal no mamífero como el pez cebra, se ha confirmado que AHR tiene un papel causal en la regeneración. La activación de AHR afecta la regeneración del corazón en el pez cebra adulto y produce una expresión desregulada de genes involucrados en su función, crecimiento celular y su matriz extracelular [283]. AHR es crucial en procesos de neuroregeneración en el cerebro del pez cebra, pues regula la diferenciación de la ependimoglia hacia neuronas post-mitóticas [284]. La activación de AHR por TCCD inhibe la regeneración de la aleta de pez cebra y, en estos modelos, un análisis genómico reciente reveló una interacción funcional bien establecida entre AHR y la vía de transducción de señales Wnt/ $\beta$ -catenina [285]-[288].

En la actualidad, los trabajos que se realizan en el campo de la regeneración hepática se encaminan hacia dos objetivos: conocimiento de los mecanismos intrínsecos que regulan dicho proceso, y modulación farmacológica del mismo; todo ello dirigido a un mayor perfeccionamiento de las técnicas de extracción, preservación e implante hepático. Los mecanismos e intermediarios moleculares por los que AHR puede contribuir al control de la regeneración de tejidos necesitan ser esclarecidos. Así este trabajo podrá contribuir en el campo de la medicina regenerativa hepática tanto a nivel de investigación básica como aplicada. Es clave la investigación en herramientas que potencien e incrementen la eficiencia de la regeneración del hígado en pacientes sometidos a resección hepática debida a

## 1.2. INTRODUCCIÓN I

---

patologías que impliquen pérdida de masa o funcionalidad hepática como son el hepatocarcinoma, la exposición a agentes químicos, las enfermedades autoinmunes o la cirrosis hepática.

## 1.2. INTRODUCCIÓN I

---



## 1.3. Objetivos I

En la actualidad, el carcinoma hepatocelular es el tumor primario maligno más común que se desarrolla en el hígado [289]. Se trata de uno de los tipos de cáncer mayoritario en todo el mundo, siendo el séptimo más frecuente y el segundo con mayor tasa de mortalidad [290], [291]. Además, otros tumores como el cáncer de colon y recto suelen presentar metástasis en el hígado [292]. Los tratamientos con fármacos como el inhibidor multiquinasa Sorafenib, han resultado ser poco beneficiosos, con un limitado aumento de la supervivencia de los pacientes [293]. Así, de todas las posibilidades terapéuticas destinadas al tratamiento de estos tumores, la resección hepática es el único tratamiento con resultado curativo demostrado [294], [295]. Los estudios de regeneración hepática en humanos resultan complicados de realizar debido a la presencia de diversos factores como son: la heterogeneidad de la etiología, el tratamiento quimioterápico previo, la edad del paciente o la presencia de enfermedad primaria hepática. Sin embargo, los modelos experimentales se han mostrado como una herramienta útil para el estudio de los mecanismos fisiológicos implicados en la regeneración hepática [296]. Así el objetivo general de este capítulo ha sido estudiar la implicación de AHR en la regeneración hepática ensayada en un modelo de hepatectomía parcial (2/3) en ratón. Para ello, hemos abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la relación de AHR con las principales citoquinas que intervienen en la primera etapa de la regeneración (“priming phase”) y la consiguiente activación de las respuestas proliferativas involucradas.
2. Analizar si AHR afecta al estado de diferenciación y pluripotencia del hígado durante el proceso regenerativo del hígado y, por ende, investigar la respuesta regenerativa inducida por la activación de células madre hepáticas.
3. Estudiar el papel de AHR en la modulación de la ruta Hippo y Wnt/ $\beta$ -catenina durante la regeneración hepática.
4. Identificar si AHR modula el cambio en el perfil metabólico tras la cirugía de resección del hígado.

### 1.3. OBJETIVOS I

---

## 1.4. Resultados I

### 1.4.1. Ahr es inducido y activado en la regeneración hepática independientemente de ligando exógeno

Para investigar el papel de Ahr en la regeneración hepática, primero analizamos si la hepatectomía parcial de 2/3 del hígado (en adelante HPx) podría alterar sus niveles de expresión en ratones *Ahr+/+*. Los niveles de proteína y ARNm de Ahr aumentaron de manera gradual y transitoria en el hígado después de la HPx. La expresión de ARNm de Ahr alcanzó valores máximos a las 8 h (**Figura 1.7D**), mientras que los niveles de proteína aumentaron de forma continuada hasta 3 días después de la HPx (**Figura 1.7A-C**). La expresión de Ahr tanto de ARNm como de proteína disminuyó al final del proceso para volver a los niveles previos medidos antes de la HPx. Como se esperaba, los ratones mutantes para Ahr (*Ahr-/-*) no mostraron expresión proteica de Ahr en el hígado antes o después de HPx (**Figura 1.7C**).

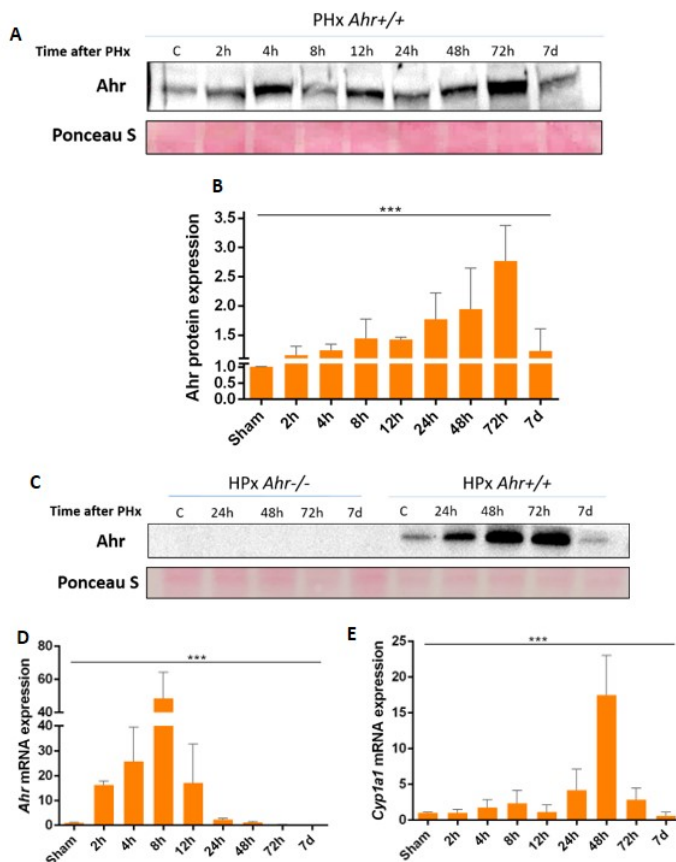
Para evaluar la funcionalidad del receptor, analizamos la expresión de su diana transcripcional *Cyp1a1*, cuyos niveles también aumentaron alcanzando valores máximos 2 días después de la HPx, para disminuir a valores basales similares a los encontrados pre-HPx (**Figura 1.7E**).

**Estos resultados indicaron que la transcripción de Ahr fue inducida por la HPx de manera transitoria, y que la proteína receptora producida posteriormente fue transcripcionalmente activa después de una respuesta regenerativa fisiológica en ausencia de ligando exógeno.**

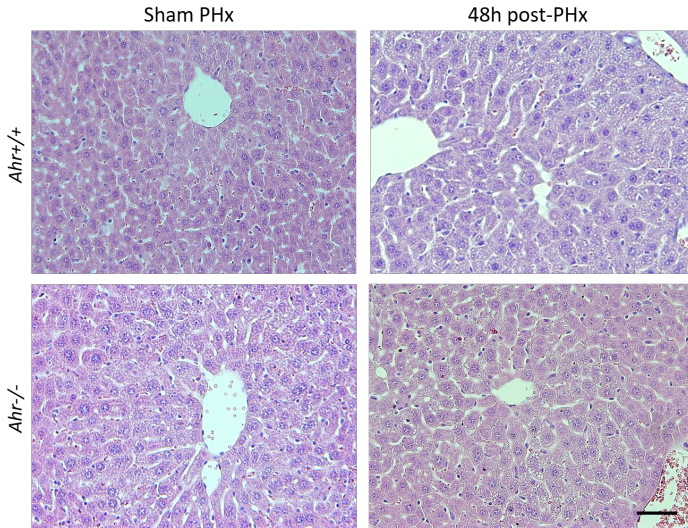
### 1.4.2. La ausencia de Ahr acelera la regeneración hepática tras la hepatectomía parcial

Después de la resección hepática, el examen macroscópico de *visu* de los hígados 72 h después, no reveló diferencias significativas en el área necrosada cercana al área de extirpación de los lóbulos, la inflamación o el color del tejido (tonalidades pálidas del hígado podrían indicar vascularización alterada tras la cirugía), entre los ratones *Ahr+/+* y *Ahr-/-* o con respecto a los ratones con operación

## 1.4. RESULTADOS I



**Figura 1.7: Ahr se induce y activa en el hígado después de la HPx.** (A,B) La expresión de proteína de Ahr se analizó en extractos de hígado de ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> en los tiempos indicados después de la HPx mediante *Western Blot*. Se empleó la tinción con *Ponceau* para normalizar los niveles de expresión de proteína. (C) La expresión de proteína de Ahr se analizó en extractos de hígado de ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> y *Ahr*<sup>-/-</sup> en los tiempos indicados después de la HPx mediante *Western Blot*. Se empleó la tinción con *Ponceau* para normalizar los niveles de expresión de proteína. (D-E) Perfiles de expresión de ARNm de *Ahr* (D) y de su diana transcripcional *Cyp1a1* (E) en ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> en los tiempos indicados después de la HPx usando RT-qPCR. Los niveles de expresión de *Gapdh* se usaron para normalizar la expresión del gen de interés ( $\Delta\text{Ct}$ ) y  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  para calcular los cambios en los niveles de ARNm con respecto a los ratones de tipo salvaje con cirugía simulada. \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

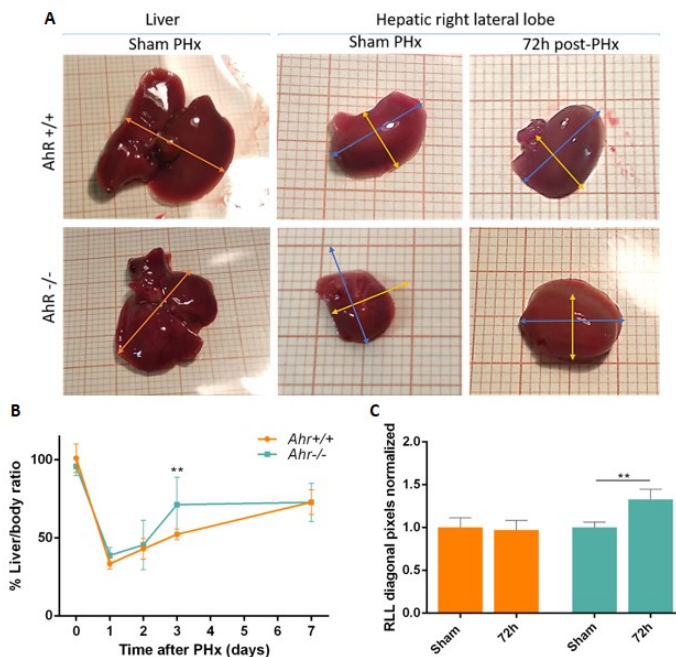


**Figura 1.8: Análisis microscópico de la estructura hepática 48 h tras la HPx.** Imágenes representativas de la tinción (H&E) de secciones de hígados de ratones *Ahr+/+* y *Ahr-/-*. La barra corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

simulada (Figura I. 9A). El análisis microscópico de secciones de hígado teñidas con Hematoxilina-Eosina (H&E) y obtenidas 48 h después de la HPx, tampoco mostró diferencias llamativas (**Figura 1.8**). En ambos casos, podría apreciarse una expansión similar del espacio de *Disse*, lo cual es clave para favorecer el intercambio de factores entre la sangre y los hepatocitos que inician y favorecen la regeneración [179].

Estudios anteriores han demostrado que ratones adultos *Ahr-/-* tienen una reducción significativa en el peso y tamaño del hígado [12], [297] (**Figura 1.9A**). Por esta razón, los cambios en los ratios del peso hígado/cuerpo están expresadas respecto al grupo control (o cirugía simulada) en ambos genotipos. A pesar de este fenotipo basal, la cinética de la regeneración del hígado reveló que la relación entre la masa del hígado y el peso corporal de los ratones *Ahr-/-* era mayor que la de los ratones *Ahr+/+*, estadísticamente significativa 3 días después de la HPx. Sin embargo, en ambos genotipos se alcanzó un peso similar del hígado al final del

## 1.4. RESULTADOS I



**Figura 1.9: La ausencia de Ahr aumenta la regeneración hepática después de la HPx.** (A) Imágenes macroscópicas representativas de hígados *Ahr*<sup>+/+</sup> y *Ahr*<sup>-/-</sup> sin HPx (izquierda), y de los lóbulos laterales derecho 72 h después de la HPx (derecha) y con operación simulada (centro). (B) La regeneración se cuantificó como el porcentaje de la masa del hígado frente al peso total del ratón. (C) Determinación de la longitud de la diagonal del lóbulo lateral derecho 72 h después de la HPx normalizada frente a sus controles. \*\* ( $p < 0,01$ ).

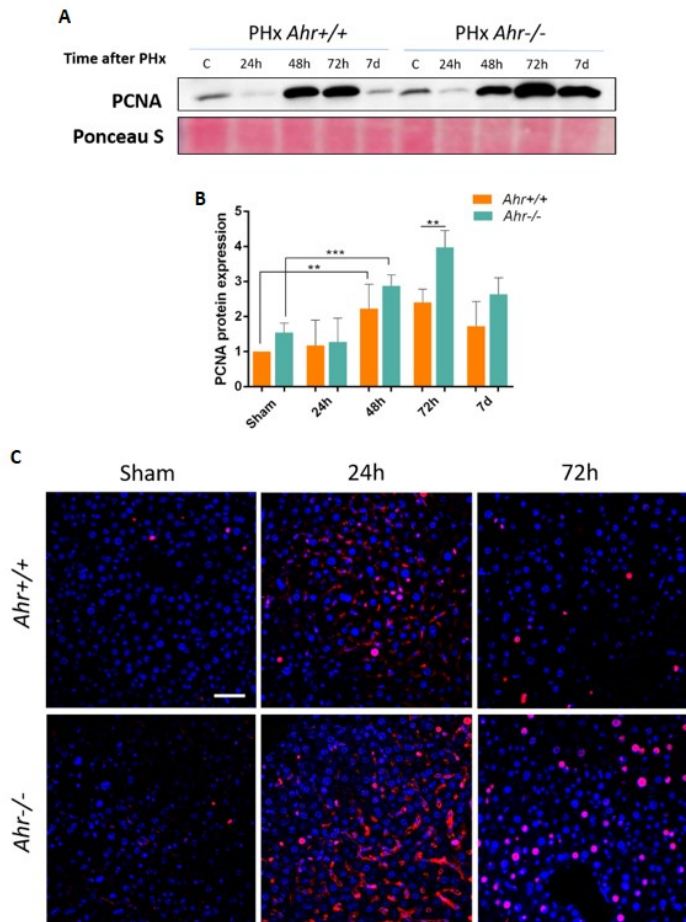
estudio (**Figura 1.9B**). Se encontró un resultado similar cuando se determinó el nivel de regeneración tomando la longitud de la diagonal del lóbulo lateral derecho del hígado como referencia 72 h después de la HPx, la cual fue mayor en los ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> que en los ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> en comparación con sus controles de operación simulada respectivamente (**Figura 1.9A,C**). A pesar de encontrar esta ventaja regenerativa en los ratones que carecían del receptor, estos mostraban menor tasa de supervivencia tras la cirugía (datos no mostrados) probablemente debido a las

complicaciones hepáticas que son inherentes a la ausencia del receptor.

En el proceso regenerativo después de la HPx, las células hepáticas no sufren daños y se requiere su proliferación más que de las células madre para restaurar el tejido del hígado [207], [298]. Por ello analizamos las diferencias en el potencial proliferativo de los hígados de ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> y *Ahr*<sup>-/-</sup> tras la cirugía. Los resultados mostraron que la expresión del marcador de proliferación PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) aumentó en ambos genotipos con perfiles similares, aunque se encontró un mayor incremento a las 72 h después de la HPx en los hígados *Ahr*<sup>-/-</sup> en comparación con los hígados *Ahr*<sup>+/+</sup> (**Figura 1.10A,B**). Estos resultados correlacionan positivamente con el aumento del ratio de los pesos hígado/masa corporal encontrado a las 72 h en ratones *Ahr*<sup>-/-</sup>. De hecho, los niveles de PCNA ya eran más altos en los hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> que en ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> en condiciones simuladas basales (**Figura 1.10A,B**). Los experimentos de inmunofluorescencia respaldaron además un mayor número de células con marcaje de PCNA nuclear en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> que en ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> a las 72 h después de la HPx (**Figura 1.10C**). En etapas tempranas (por ejemplo, tras 24 h de la HPx), los hígados de ambos genotipos mostraron una cantidad basal de proteína PCNA citosólica, tal vez como resultado del traslado del núcleo al citoplasma que tiene lugar para proteger de la apoptosis y mantener la supervivencia celular [299], [300].

Otros genes relacionados con el ciclo celular como ciclina D1 y p-Rb mostraron una regulación positiva tras la HPx en ambos grupos. Ciclina D1 se sobreexpresó en los niveles de ARNm (*Ccnd1*) y proteína en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> con un patrón que tiene un pico máximo a las 48-72 h después de HPx (**Figura 1.11A-C**). De manera consistente, los niveles de fosforilación normalizados (pRb/Rb) de la proteína reguladora del ciclo celular Retinoblastoma fueron significativamente más altos en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> que en los *Ahr*<sup>+/+</sup> a las 72 h después de la HPx (**Figura 1.11D**). Además, la proteína p53, un factor importante que modula positivamente la división celular después de la hepatectomía [301], y que previamente nuestro grupo reveló que estaba regulada positivamente en el hígado adulto no diferenciado sin Ahr [133], fue significativamente sobreexpresado en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> en todo momento después de la HPx, con un nivel

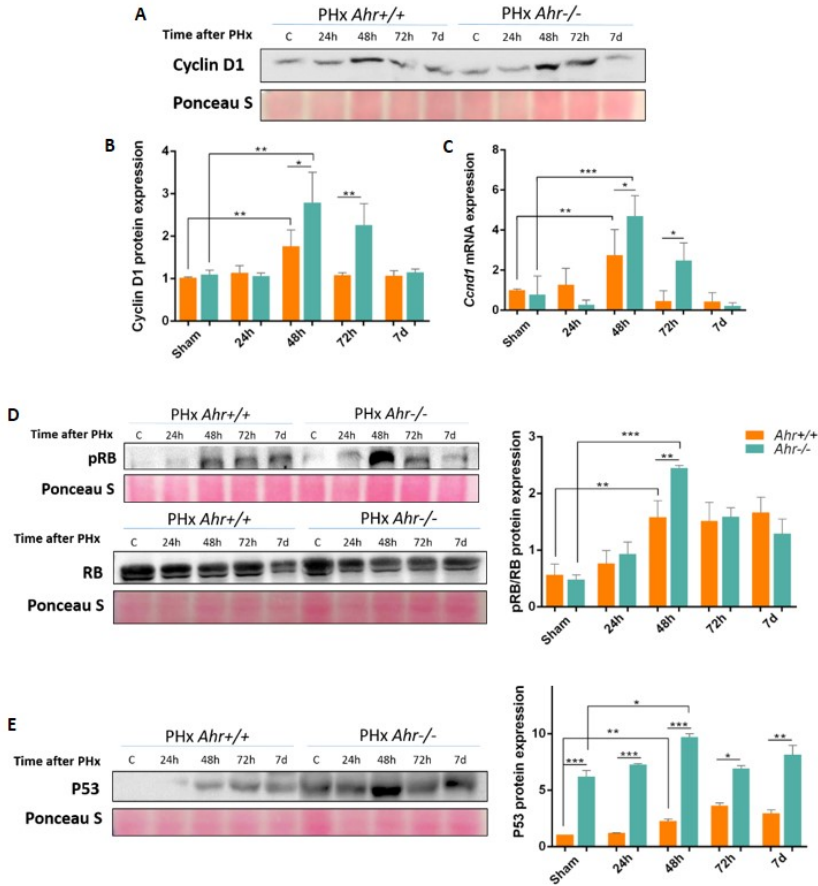
## 1.4. RESULTADOS I



**Figura 1.10: Las tasas de proliferación aumentan en los hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> después de la HPx.** (A,B) La expresión de la proteína PCNA se determinó mediante *Western Blot* e (C) inmunofluorescencia a partir de extractos de hígado de ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> y *Ahr*<sup>-/-</sup> en los tiempos indicados después de la HPx. Se usó la tinción con *Ponceau* para normalizar los niveles de proteína. *Hoechst* se utilizó para teñir los núcleos celulares. Se utilizó un microscopio confocal Olympus FV1000 y el *software* FV10 (Olympus). La barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m. \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).



## 1.4. RESULTADOS I



**Figura 1.11: Los marcadores de proliferación aumentaron en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> después de la HPx.** (A,B) La expresión de ciclina D1 se analizó a nivel de proteína mediante *Western Blot* y (C) a nivel de ARNm mediante la expresión de *Ccnd1* determinada por RT-qPCR. Expresión proteica y cuantificación determinada por *Western Blot* de pRb y Rb (D) y de p53 (E). La tinción de *Ponceau* se utilizó para normalizar los niveles de proteína. \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

## 1.4. RESULTADOS I

---

máximo a las 72 h (**Figura 1.11E**).

En conjunto, estos resultados demuestran que la ausencia de Ahr potencia los niveles de proliferación celular hepática durante la recuperación del tejido hepático tras la HPx.

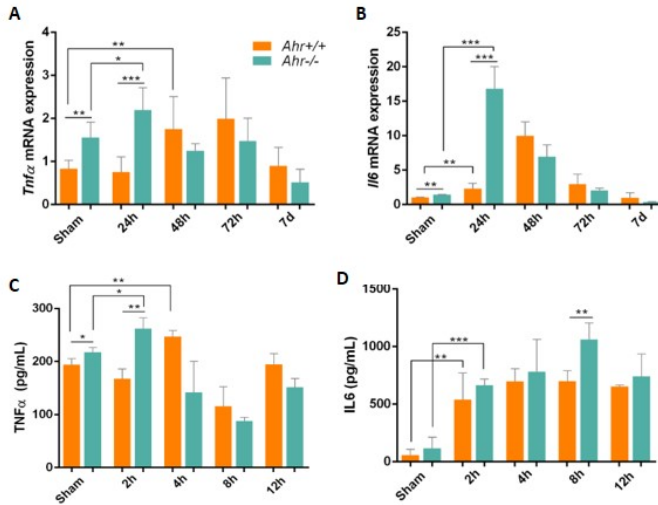
### 1.4.3. La deficiencia de Ahr afecta a la activación de la respuesta inmune innata en la fase inicial de la regeneración

Para estudiar los mecanismos potenciales a través de los cuales Ahr podría participar en la regeneración del hígado, analizamos las citoquinas que están involucradas en la respuesta inflamatoria que tiene lugar en las etapas iniciales de la regeneración [302], [303]. La expresión de *Tnf $\alpha$*  e *Il6* se reguló transitoriamente en momentos tempranos después de la HPx más marcadamente en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> que en ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> (**Figura 1.12A-B**). La medición de la concentración en suero de TNF $\alpha$  e IL6 reveló que la falta de Ahr aumentó los niveles circulantes de ambas citoquinas inmediatamente después de la HPx (por ejemplo, 2-8 h), siendo el efecto significativamente mayor en ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> (**Figura 1.12C-D**).

TNF $\alpha$  provoca la activación de NF- $\kappa$ B, que se transloca al núcleo y activa la transcripción de proteínas de fase aguda y genes proliferativos [304]. De manera consistente, la expresión de NF- $\kappa$ B fosforilado fue mayor en los hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> que en los *Ahr*<sup>+/+</sup> con niveles máximos de proteína a las 24 h tras la HPx (**Figura 1.13A-B**).

IL6 activa la vía JAK/STAT e induce la expresión de oncogenes de respuesta temprana inmediata, que son responsables del inicio del ciclo celular [305]. Observamos que *c-Myc*, *c-Jun* y *Stat3* se sobreexpresaron a nivel de ARNm en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> después de HPx con una expresión máxima que osciló entre 24 y 48 h (**Figura 1.13C-E**).

Dado que Ahr es un factor de transcripción bien conocido, analizamos si este receptor es necesario para mantener los niveles transcripcionales de los genes *Tnf $\alpha$* , *Il6* e *Il1* en ratones de tipo salvaje. Los experimentos de inmunoprecipi-

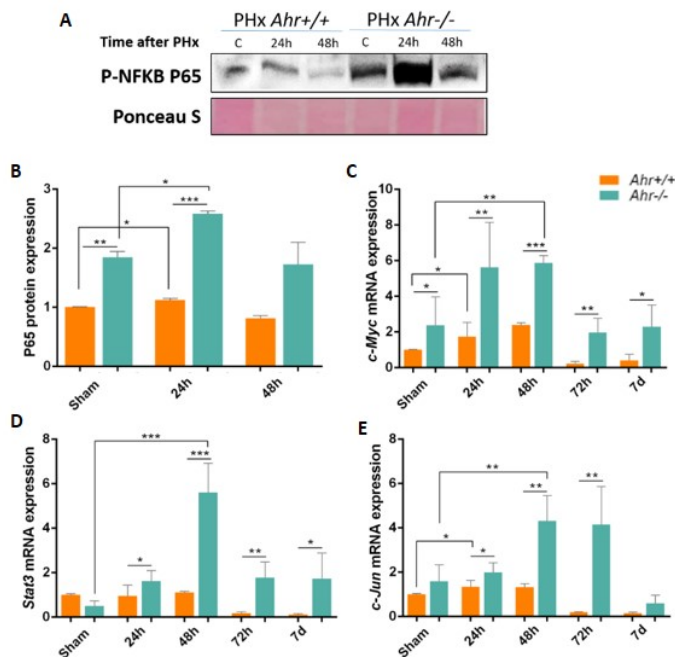


**Figura 1.12: La deficiencia de Ahr mejora la respuesta inmune al inicio de la regeneración.** Los niveles de ARNm de (A) *Tnfa* e (B) *Il6* se determinaron mediante RT-qPCR. *Gapdh* se usó para normalizar la expresión del gen de interés. Los niveles de citoquinas para (C) TNF $\alpha$  e (D) IL6 se midieron en muestras de suero tomadas de ratones *Ahr+/+* y *Ahr-/-*. \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

tación de cromatina (ChIP) revelaron que Ahr se une a la región promotora de esos tres genes poco después de la HPx (**Figura 1.14A-C**), lo que sugiere que este receptor regula los niveles fisiológicos de estas citoquinas en respuesta a la HPx, y que la ausencia de Ahr puede producir un aumento en su expresión y actividad.

Estos resultados sugieren que la deficiencia de Ahr mejora la red de citoquinas en la "priming phase" de la regeneración, lo que explicaría la mayor tasa de proliferación detectada en animales deficientes en el receptor durante este proceso.

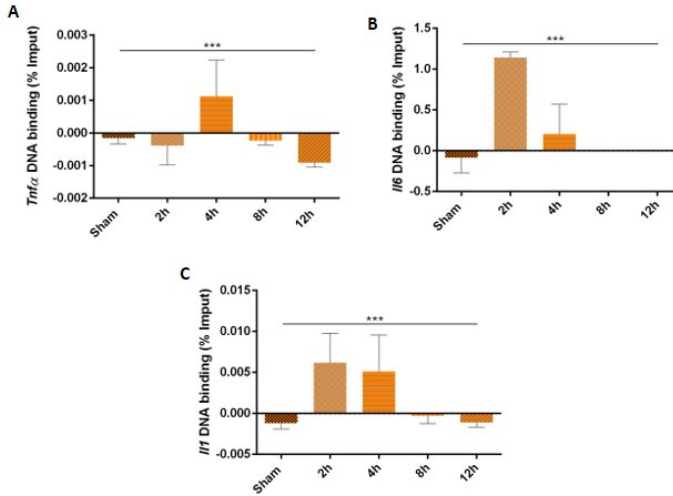
## 1.4. RESULTADOS I



**Figura 1.13: Mayor activación de las respuestas reguladas por  $TNF\alpha$  e  $IL6$  en ausencia de *Ahr* tras la HPx.** (A,B) Se analizó la expresión proteica de p-p65 por *Western Blot*. La tinción de *Ponceau* se usó para normalizar los niveles de proteína. La expresión de ARNm de (C) *c-Myc*, (D) *c-Jun* y (E) *Stat3* se determinó usando RT-qPCR. *Gapdh* se usó para normalizar la expresión del gen de interés. \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

### 1.4.4. Los marcadores de pluripotencia son modulados de forma dependiente de *Ahr* durante la regeneración hepática

*Ahr* ha sido identificado como un regulador de los marcadores de pluripotencialidad OCT4, NANOG [39], [151] y SOX2 [165]. Por ello analizamos si existían cambios en la expresión de estos factores en hígados de ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> y *Ahr*<sup>-/-</sup> sometidos a HPx. Los experimentos de expresión de ARNm revelaron que *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* y *Klf4* aumentaron significativamente su expresión en rato-

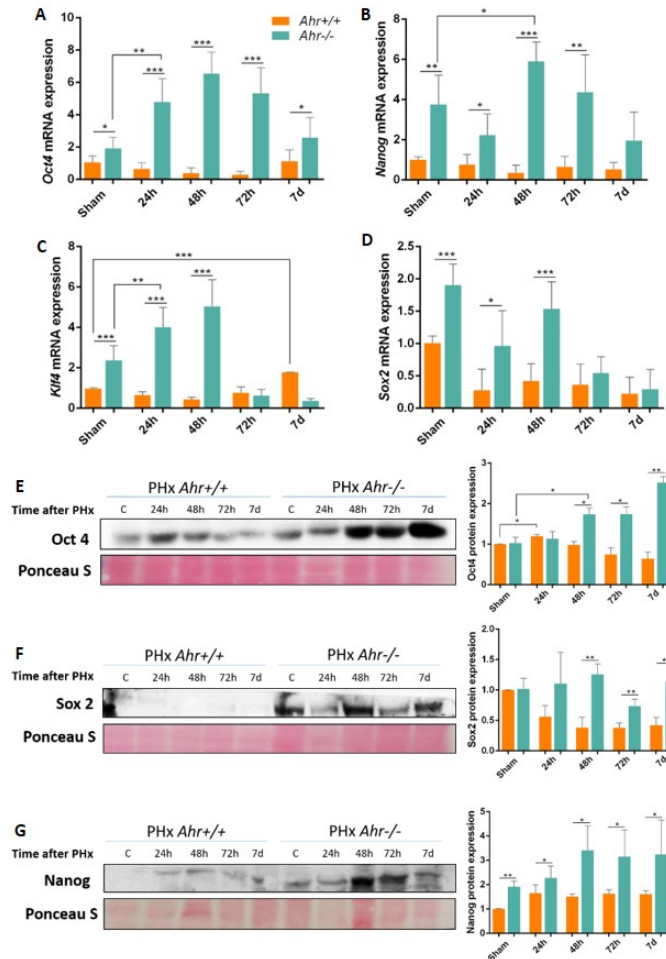


**Figura 1.14: Ahr regula de forma directa la expresión de las citoquinas en la fase inicial de la regeneración.** Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para la unión de Ahr a los sitios de unión de XRE ubicados en el promotor de (A) *Tnfa*, (B) *Il6* e (C) *Il1*. Se utilizó qPCR para cuantificar los cambios en la unión al ADN. \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

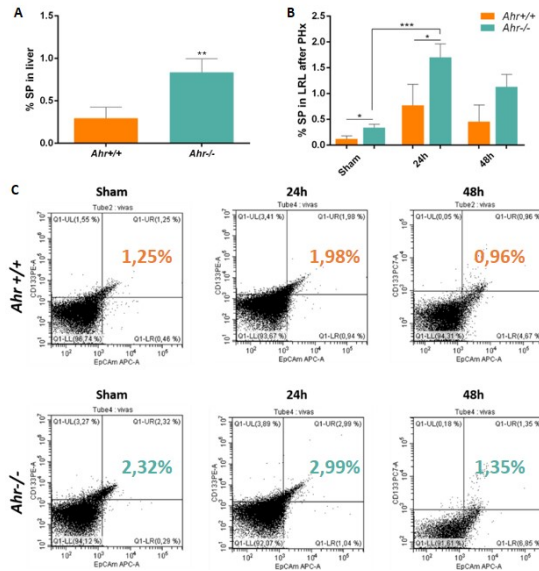
nes *Ahr*<sup>-/-</sup> durante la regeneración hepática en comparación con los niveles en ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> (**Figura 1.15A-D**). El análisis de expresión de proteínas también mostraron mayores cantidades de Oct4, Nanog y Sox2 en hígados sin Ahr (**Figura 1.15E-G**). De manera consistente, el patrón de expresión de proteínas para estos marcadores siguió los perfiles de expresión de ARNm después de la HPx, particularmente en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup>. Además, mientras que los niveles de ARNm de Oct4, Nanog y Sox2 disminuyeron notablemente al final de la regeneración en ausencia de Ahr, su expresión proteica se mantuvo significativamente más alta incluso 7 días después de la HPx.

Así, la deficiencia de Ahr induce un estado indiferenciado y pluripotente en el hígado que aumenta tras la HPx y que podría mejorar su potencial regenerativo.

## 1.4. RESULTADOS I



**Figura 1.15: Los marcadores de pluripotencialidad se modulan de manera dependiente de Ahr.** La expresión de ARNm de (A) *Oct4*, (B) *Nanog*, (C) *Sox2* y (D) *Klf4* se determinó mediante RT-qPCR. *Gapdh* se usó para normalizar la expresión génica. La expresión de proteínas de (E) *Oct4*, (F) *Nanog* y (G) *Sox2* se analizó en extractos de hígado mediante *Western Blot*. Se usó la tinción con *Poncaeu S* para normalizar los niveles de proteína. \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).



**Figura 1.16: La falta de Ahr expande la “Side Population”.** Las muestras se procesaron para aislar y cuantificar las células SP+ mediante citometría en (A) el hígado total y (B,C) el lóbulo lateral derecho. Las células SP+ se expresan con respecto al número total de células hepáticas. \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

### 1.4.5. Expansión de la “side population” en ausencia de Ahr

Además de los hepatocitos, las células madre del hígado también proliferan y se expanden para restaurar la masa y la funcionalidad hepáticas [209]. Determinamos las células positivas SP+ presentes en los hígados de ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> y *Ahr*<sup>-/-</sup> como una indicación de su contenido en células madre indiferenciadas. Encontramos una expansión transitoria de células SP+ a tiempos tempranos después de la HPx en ambos genotipos, siendo el aumento significativamente mayor en ausencia de Ahr (**Figura 1.16**).

Este fenotipo celular se ha relacionado con los factores de pluripotencia Oct4, Nanog, Sox2 y Klf4. Por esto motivo analizamos la expresión de ARNm de estos

## 1.4. RESULTADOS I

---

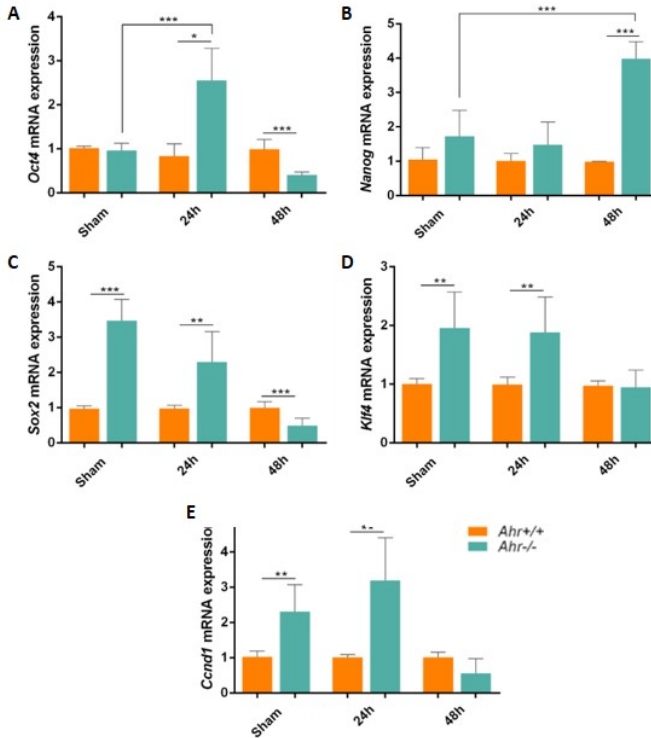
factores en esta población celular aislada del hígado. Observamos un aumento significativo en los niveles de ARNm de *Oct4* a las 24 h y *Nanog* a las 48 h (**Figura 1.17A-B**) después de la HPx en células SP+ de hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup>. Los ARNm de *Sox2* y *Klf4* ya estaban en niveles más altos en condiciones basales (ratones operados simuladamente) en células *Ahr*<sup>-/-</sup> SP+ para disminuir gradualmente a valores de control a las 48 h después de HPx (**Figura 1.17C-D**). Además, el gen regulador positivo del ciclo celular, *Ccnd1*, también se reguló en condiciones basales y en las etapas iniciales después de la HPx en células *Ahr*<sup>-/-</sup> SP+ (**Figura 1.17E**).

**Por lo tanto, es probable que un mayor porcentaje de células con un fenotipo de célula madre en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> en condiciones basales mejore el potencial regenerativo de estos ratones y, es coherente, con el aumento de expresión de marcadores de pluripotencia e indiferenciación en esta población celular.**

### 1.4.6. En ausencia de *Ahr* se produjo una regulación positiva de las vías de señalización de *Hippo/YAP* y *Wnt/β-catenina*

La ruta *Hippo* juega un papel fundamental en el control del tamaño de los órganos, el mantenimiento de la población de células madre y la regulación de la diferenciación celular [306], [307]. Además, el destino entre los progenitores hepáticos y los hepatocitos también está controlado por la señalización de esta ruta y, de hecho, cambios endógenos en la ruta *Hippo* pueden provocar la reprogramación de los hepatocitos. Una elevada expresión de YAP en células hepáticas define una identidad de célula *stem* y provoca un aumento de su proliferación [251]. Con la HPx la expresión de la proteína del factor transcripcional Yap aumentó en el hígado de ratones de ambos genotipos, aunque los niveles de Yap fosforilado (p-Yap) fueron mayores en condiciones basales y en respuesta a HPx en ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> que en ratones *Ahr*<sup>+/+</sup>. En consecuencia, la relación p-Yap/Yap se mantuvo significativamente mayor en ratones sin *Ahr* que en animales de tipo salvaje antes (operados de forma simulada) y durante la regeneración des-





**Figura 1.17:** La ausencia de *Ahr* aumenta la expresión de los marcadores de pluripotencia en el hígado en regeneración. El ARNm se purificó a partir de células SP+ de ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> y *Ahr*<sup>-/-</sup> y se utilizó para analizar mediante RT-qPCR la expresión de (A) *Oct4*, (B) *Nanog*, (C) *Sox2*, (D) *Klf4* y (E) *Ccnd1*. *Gapdh* se usó para normalizar la expresión génica. \* (p < 0,05) \*\* (p < 0,01); \*\*\* (p < 0,005).

pués de la HPx (**Figura 1.18A**). La fosforilación de Yap induce su retención en el citosol y, en consecuencia, la proporción de Yap nuclear frente a citosólico se redujo en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> (**Figura 1.18B**). Analizamos las proteínas quinasas responsables de la fosforilación de Yap, *Lats1* y *Lats2*, y estaban reguladas positivamente a nivel de ARNm en ausencia de *Ahr* después de la HPx de acuerdo con el aumento observado en la relación p-Yap/Yap ((**Figura 1.18C-**

## 1.4. RESULTADOS I

---

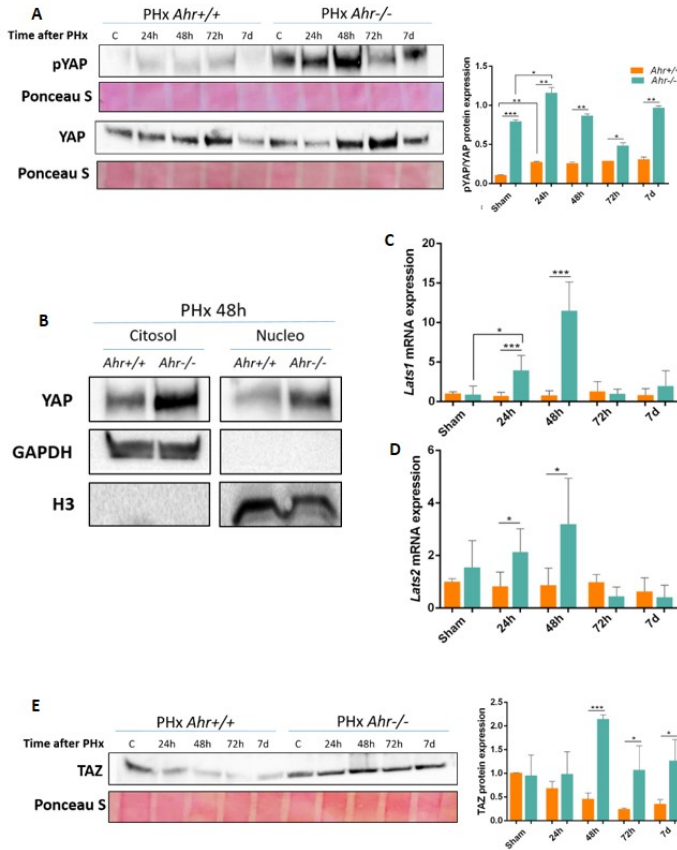
D). A consecuencia de la mayor activación de la ruta Hippo/YAP, su efector transcripcional Taz mostró un aumento significativo en los niveles de proteína de las 48 h a los 7 días en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> ((**Figura 1.18E**)).

Otra ruta de gran importancia en el hígado es la ruta *Wnt*/ $\beta$ -*catenina*, la cual es fundamental en su desarrollo embrionario, proliferación y maduración [133], [308], [309]. La expresión de  $\beta$ -catenina aumentó después de la HPx en hígados de ambos genotipos, aunque los niveles alcanzados a tiempos cortos después de la HPx (por ejemplo, 48 h) fueron significativamente más altos en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> que en ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> ((**Figura 1.19A**)). La distribución intracelular de  $\beta$ -catenina reveló que sus cantidades nucleares aumentaron en ausencia de Ahr con respecto a los hígados que expresan Ahr ((**Figura 1.19B**)), lo que sugiere una mayor actividad transcripcional. De manera consistente, la expresión de ARNm de la diana transcripcional de  $\beta$ -catenina, *Axin2*, aumentó significativamente en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> en los mismos tiempos después de la HPx en los que aumentaron la expresión de la proteína  $\beta$ -catenina y su localización nuclear ((**Figura 1.19C**)).

Estos resultados sugieren que la deficiencia de Ahr intensifica la regulación de las vías *Hippo*/*YAP* y *Wnt*/ $\beta$ -*catenina*, las cuales afectan a la pluripotencialidad del hígado, lo que probablemente contribuye a su mejor respuesta tras la HPx.

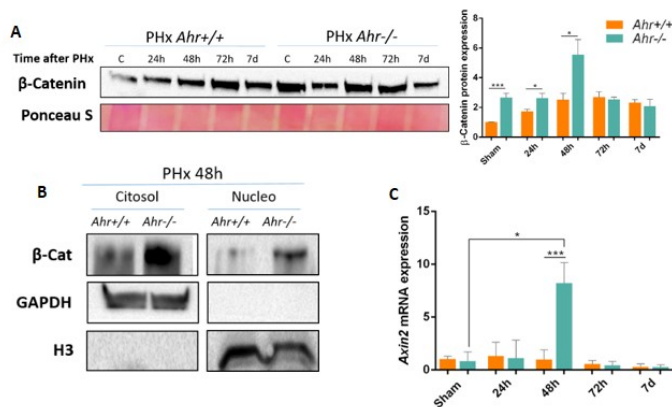
### 1.4.7. Los cambios en el perfil metabólico presentan diferencias en ausencia de Ahr durante la regeneración hepática

La HPx implica una pérdida significativa de glucógeno, el cual es esencial para el metabolismo hepático [310]. Esto provoca que en la fase de inicio de la regeneración se reduzca la cantidad de glucosa en sangre y sean necesarias fuentes alternativas de energía como los lípidos [311]. Por tanto, se midió la cantidad de glucosa en sangre en ratones de ambos genotipos después de la HPx y se observó que efectivamente había una reducción. Sin embargo, los ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> tenían niveles de glucosa significativamente más bajos ya en condiciones basales (ope-



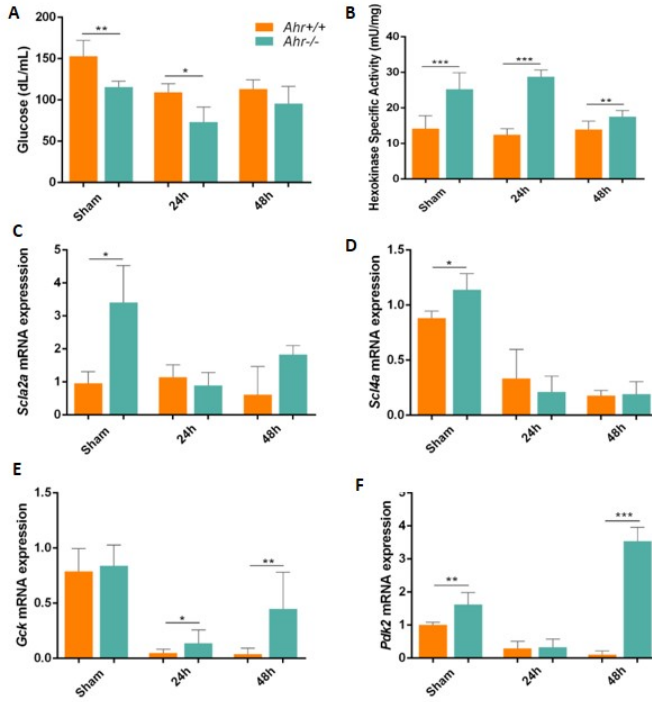
**Figura 1.18: Los hígados sin Ahr muestran una regulación positiva de la ruta Hippo.** La expresión total de las proteínas (A) p-YAP/YAP, de (E) TAZ y (B) los niveles citosólicos y nucleares de YAP se analizaron en extractos de hígado de mediante *Western Blot*. Se usó la tinción con *Ponceau* para normalizar los niveles de proteína total y GAPDH e Histona H3 como controles para la proteína citosólica y nuclear, respectivamente. La expresión de ARNm de las quinasas (F) *Lats1* y (G) *Lats2* se cuantificó mediante RT-qPCR. *Gapdh* se usó para normalizar la expresión génica. \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

## 1.4. RESULTADOS I



**Figura 1.19: Los hígados sin *Ahr* muestran una regulación positiva de la ruta *Wnt*/ $\beta$ -catenina.** La expresión total de la proteína (A)  $\beta$ -catenina y (B) sus niveles citosólicos y nucleares se analizaron en extractos de hígado de mediante *Western Blot*. Se usó la tinción con *Ponceau* para normalizar los niveles de proteína total y GAPDH e Histona H3 como controles para la proteína citosólica y nuclear, respectivamente. La expresión de ARNm de su diana transcripcional (C) *Axin2* se cuantificó mediante RT-qPCR. *Gapdh* se usó para normalizar la expresión génica. \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

radros de forma simulada) y después de 24 h de la HPx que los ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> ((**Figura 1.20A**). Esta diferencia podría ser debida a que en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> hubiera un transporte de glucosa más eficiente, ya que la expresión génica de *Slc2a2*, el principal transportador de glucosa hepática [312], se encontraba sobreexpresado respecto a hígados de ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> antes de realizarse la HPx ((**Figura 1.20C-D**). La baja concentración de glucosa en sangre causa una reducción de la expresión genes implicados en su metabolismo [313], pero en animales *Ahr*<sup>-/-</sup> tras la HPx se observa una recuperación prematura de la expresión génica de enzimas implicadas en la glucólisis, *Gck* y *Pdk2* ((**Figura 1.20F**). Además, analizamos la actividad enzimática de la hexoquinasa, la cual no cambia su actividad tras la HPx debido a que partir de ella se obtiene un porcentaje muy bajo de ATP en células parenquimáticas del hígado. Sin embargo, en células no parenquimáticas es la mayor responsable de la fosforilación de la glucosa [314],

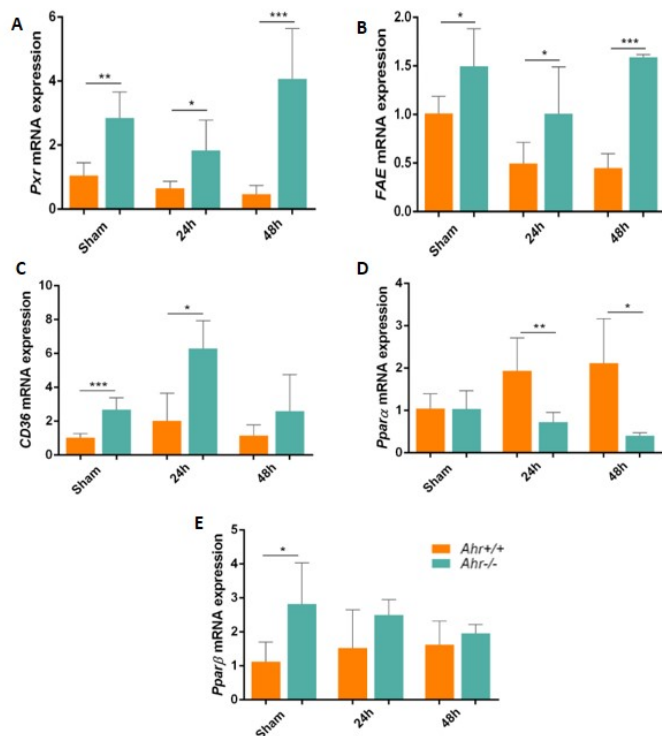


**Figura 1.20: Cambios en el metabolismo de la glucosa en ausencia de Ahr durante la regeneración hepática.** (A) Concentración de glucosa en sangre obtenida mediante un glucómetro . (B) Actividad enzimática de la hexoquinasa en homogeneizados de hígado . Expresión génica determinada mediante RT-qPCR de los genes (C) *Slc2a2* , (D) *Scl2a4* , (E) *Gck* y (F) *Pdk2* . *Gapdh* se empleó para normalizar la expresión génica. \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

como, por ejemplo, son las células progenitoras hepáticas que presentan características similares a las células ovas [315]. Encontramos que antes y tras la HPx la actividad enzimática de la hexoquinasa fue superior en animales *Ahr*<sup>-/-</sup>, lo que podría deberse al aumento en el número de células con fenotipo *stem* antes y tras la HPx ((Figura 1.20B).

Las diferencias encontradas en el metabolismo glucolítico entre ambos genotipos podrían estar relacionadas con un metabolismo lipídico alterado. Esto nos

## 1.4. RESULTADOS I



**Figura 1.21: Cambios en el metabolismo lipídico en ausencia de *Ahr* durante la regeneración hepática.** Se analizó la expresión de ARNm de (A) *Pxr*, (B) *Fae*, (C) *Cd36*, (D) *Pparα* y (E) *Pparβ* por RT-qPCR en extractos de hígado. *Gapdh* se empleó para normalizar la expresión génica. \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

llevó a analizar la expresión de genes responsables de regular la lipogénesis, la  $\beta$ -oxidación y el transporte de lípidos. La expresión de ARNm de la elongasa de ácidos grasos libres de cadena larga, *Fae*, el receptor Pregnane-X, *Pxr*, y el transportador de ácidos grasos libres, *Cd36* aumentó en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> en condiciones basales ((**Figura 1.21A-C**). Tras la HPx, *Fae* y *Pxr* exhibieron una regulación negativa transitoria que volvió a los valores basales a las 48 h. *Cd36*, por el contrario, se reguló a tiempos más cortos (por ejemplo, 24 h) para

disminuir a los niveles iniciales a las 48 h. También se analizaron reguladores adicionales del metabolismo de los lípidos, como *Ppara* y *Ppar* $\beta$  [316]. Mientras que *Ppar* $\beta$  no mostró diferencias significativas en la expresión entre genotipos después de la HPx, *Ppara* aumentó en hígados de ratones *Ahr* $+/+$  después de la HPx en comparación con hígados de ratones *Ahr* $-/-$  ((**Figura 1.21D-E**), produciendo así un perfil de expresión opuesto al de *Fae*, *Pxr*, *CD36* y *Ppara*.

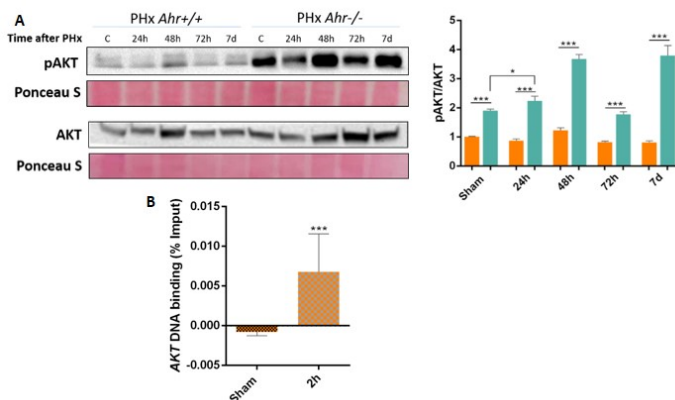
AKT es un factor adicional involucrado en las vías de señalización que controlan el metabolismo hepático a través de mTORC1 [317], [318]. Además, con cierto grado de regeneración alcanzado se reanudan de nuevo de las funciones gluconeogénicas, lo que se traduce en el incremento de la fosforilación de AKT [319]. El análisis de expresión de proteínas reveló un aumento en la relación pAKT/AKT en hígados de ratones *Ahr* $-/-$  en condiciones basales y hasta 7 días después de la HPx ((**Figura 1.22A**). También mediante el uso de inmunoprecipitación de cromatina, encontramos que Ahr se une al promotor del gen Akt en el hígado *Ahr* $+/+$  tras la HPx ((**Figura 1.22B**).

**En conjunto, estos datos sugieren la mejora del metabolismo lipídico y glicolítico en los ratones *Ahr* $-/-$ , y esta respuesta probablemente aumenta la capacidad de regeneración del hígado.**

#### 1.4.8. El trasplante de células hepáticas *Ahr* $-/-$ mejoró el proceso regenerativo de ratones silvestres hepatectomizados

El trasplante hepático es uno de los tratamientos potencialmente útiles para tratar la insuficiencia hepática con resultados demostrados en la mejoría de la supervivencia de los pacientes [320], [321]. Como posible alternativa al trasplante hepático ortotópico, el trasplante de los hepatocitos podría cubrir las mismas necesidades, además de ser técnicamente más sencillo. Los hepatocitos aislados con la técnica de digestión enzimática con colagenasa conservan sus características ultraestructurales y su capacidad metabólica [322], [323]. Para llevar a cabo el trasplante de los hepatocitos el bazo se considera el mejor lugar de intervención, ya que entre el 50-85% de los hepatocitos inyectados migran al hígado a través

## 1.4. RESULTADOS I



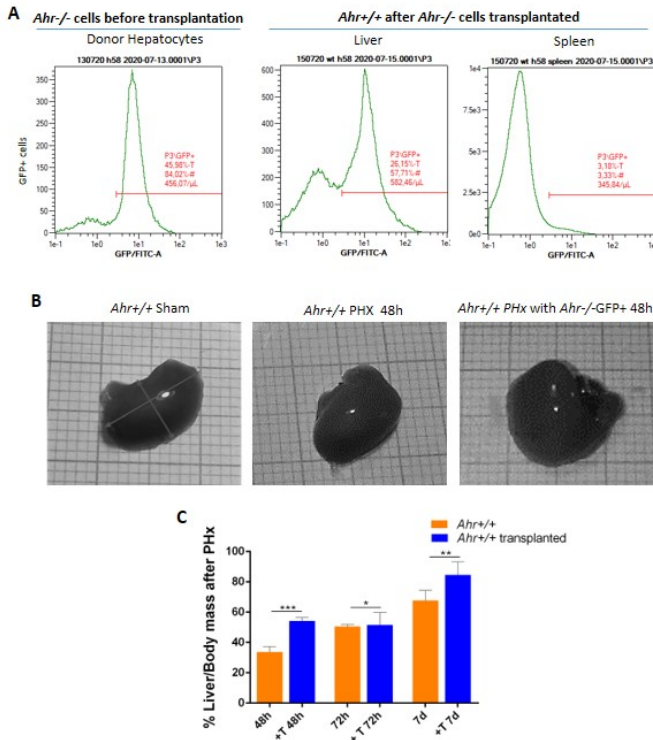
**Figura 1.22: Regulación de AKT mediada por Ahr durante la regeneración hepática.** (A) La relación p-Akt/Akt se analizó mediante *Western Blot*. Se usó la tinción de *Ponceau* para normalizar los niveles de proteína. (B) La unión de Ahr al promotor del gen *Akt* se determinó mediante inmunoprecipitación de cromatina. Se usó qPCR para cuantificar los cambios en la unión del ADN. *Gapdh* se empleó para normalizar la expresión génica. \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

de la vena esplénica y colonizan los lobulillos hepáticos [324], [325]. Teniendo en cuenta estas circunstancias y analizando nuestros resultados anteriores, decidimos llevar a cabo el trasplante de células aisladas de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> que expresaban YFP (*Yellow Fluorescence Protein*) a través del bazo de ratones silvestres previamente hepatectomizados. Encontramos que las células migraban desde el bazo al hígado donde se implantaban y permanecían al menos 48 h después de la intervención ((**Figura 1.23A**)). Además, estos ratones mostraban una mejoría significativa en la regeneración en comparación a los ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> hepatectomizados que no había sido trasplantados ((**Figura 1.23B**)). Todo parece indicar que las células *Ahr*<sup>-/-</sup> estarían dividiéndose y/o fomentando la proliferación de las células remanentes del hígado. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con cautela, ya que habría que hacer un estudio más detallado de este modelo para confirmar que la ventaja regenerativa se debía no solo al trasplante celular



sino también a que estas células no expresaban Ahr.

Estos resultados sugieren a priori que el trasplante de células *Ahr*<sup>-/-</sup> mejora la eficiencia regenerativa de ratones silvestres que han sufrido una HPx.



**Figura 1.23: El trasplante de células *Ahr*<sup>-/-</sup> potencia la regeneración hepática.** (A) Se analizó el porcentaje total de células GFP<sup>+</sup> mediante citometría. (B) Imágenes representativas del lóbulo lateral derecho de los hígados en diferentes condiciones ensayadas explicadas en el texto. (C) La regeneración se cuantificó como el porcentaje de la masa del hígado frente al peso total del ratón. \* (p < 0,05) \*\* (p < 0,01); \*\*\* (p < 0,005).

## 1.4. RESULTADOS I

---

## 1.5. Discusión I

El hígado es el principal órgano responsable de la desintoxicación del organismo y, como resultado, está constantemente expuesto a una amplia variedad de compuestos tóxicos. Este hecho junto con otros eventos puede dañarlo, e incluso, conducir al desarrollo de tumores. Sorprendentemente, el hígado puede reaccionar a tales lesiones activando un proceso regenerativo destinado a reparar la arquitectura y la función del tejido hepático. De hecho, se puede lograr una regeneración hepática completa después de la exposición a agentes inductores de necrosis o después de una HPx en mamíferos [206], [326]. Desde una perspectiva humana, conocer los mecanismos que impulsan la regeneración hepática es esencial para acelerar la regeneración del tejido sano restante tras una resección quirúrgica del tejido hepático dañado y, en último término, mejorar la tasa de supervivencia de estos pacientes.

Hemos demostrado en estudios anteriores del grupo de investigación que se requiere Ahr para ajustar la regeneración del hígado después de una lesión tóxica aguda [151]. Además nuestro trabajo junto con el de otros investigadores, ha revelado que Ahr tiene un papel clave para reducir el desarrollo de hepatocarcinomas en ratones causados por la exposición post-natal a la dietilnitrosamina [151], [191] y por el envejecimiento [166]. Además, nuestros resultados previos también sugieren que el mayor potencial regenerativo y la mayor susceptibilidad a la hepatocarcinogénesis de los ratones sin Ahr podrían deberse a su fenotipo hepático más indiferenciado y pluripotente [133], [151].

En otros contextos diferentes del hígado, se ha encontrado que la activación del receptor mediante ligandos exógenos vincula su participación en vías de señalización responsables de la regeneración tisular. Estos procesos regenerativos dependientes de Ahr se dan tanto en un contexto no mamífero, como es en la regeneración de la aleta caudal y del corazón en larvas de pez cebra [283], [286], como en mamíferos, tras daño agudo inducido por tóxicos en pulmón [39]. Ahr también interviene en otro modelo de regeneración como es la piel, independiente de su activación toxicológica por ligandos exógenos [152].

Sin embargo, los mecanismos fundamentales por los cuales Ahr regula la rege-

## 1.5. DISCUSIÓN I

---

neración del hígado no se han esclarecido completamente. En este estudio, hemos investigado los posibles mecanismos a través de los cuales Ahr ajusta la regeneración del hígado en respuesta a una eliminación masiva de tejido similar a la utilizada en humanos. Demostramos que Ahr tiene un importante papel en la regeneración del hígado tras una HPx, ya que se induce y activa de forma endógena sin haber tratado al individuo o al órgano con ningún compuesto tóxico que pudiera ser un ligando exógeno de esta proteína. Esta regulación positiva del receptor puede deberse a metabolitos que se acumulan en el hígado durante la regeneración y sirven como ligandos endógenos específicos para activar factores de transcripción implicados en respuesta a xenobióticos [223]. Encontramos que la delección de Ahr acelera la regeneración del hígado en ratones sometidos a HPx, lo que confirma la relevancia funcional de Ahr en este proceso. Nuestra conclusión principal es que se requiere Ahr durante la "priming phase" temprana de la regeneración del hígado para controlar la expansión de las células proliferativas con características pluripotentes y la activación de las vías de señalización que modulan la diferenciación celular y el metabolismo. En consecuencia, Ahr parece regular la reentrada de los hepatocitos desde su estado de reposo al ciclo celular proliferativo.

Por lo general, los estudios de regeneración hepática usando como modelo la HPx han revelado el potencial proliferativo de hepatocitos, los cuales previamente a la cirugía se encuentran inactivos en estado de quiescencia [206]. Este hecho ha supuesto que se asuma que estas células son la fuente a partir de la cual la masa hepática se recupera [304]. Estudios independientes han mostrado que Ahr participa como modulador del ciclo celular a través de la regulación de la progresión de fase G1/S. TCDD puede perjudicar la regeneración del hígado tras una HPx controlando los niveles de los inhibidores de ciclinas quinasas, p21Cip1 y p27Kip1 [193]. Del mismo modo, tratamientos con ligandos de Ahr producen su activación sostenida provocando parada de ciclo celular en G1 en células de hepatoma 5L [272]-[274], Hepa-1c1c7 [89] y MCF7 [275]. La inducción de *Cyp1a1* es un mecanismo de retroalimentación negativa para eliminar los ligandos endógenos de Ahr con el fin de asegurar una correcta proliferación celular [276]. *Cyp1a1* alcanzó su máxima inducción a las 48 h tras la HPx, lo que

podría ser también en este modelo un mecanismo para apagar la señalización de Ahr. Esto justifica el aumento de la expresión de proteínas responsables de ciclo celular como son la Ciclina D1 y PCNA a partir de las 48 h. Por lo tanto, la actividad de Ahr puede ajustarse en el hígado para controlar la proliferación y la regeneración evitando eventualmente el crecimiento excesivo de órganos. Curiosamente, la expresión y la actividad transcripcional de Ahr aumentaron notablemente al inicio y durante la regeneración, lo que sugiere su papel en la limitación del crecimiento del hígado y el apoyo a un proceso regenerativo más eficiente en ratones *Ahr*<sup>-/-</sup>. De manera constante, la expresión de los marcadores de ciclo celular, Ciclina D1 y PCNA, aumentó rápidamente en hígados de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup>. La ausencia de Ahr también puede favorecer la liberación de proteínas E2F de pRb inactivado y la entrada en el ciclo celular dado que Ahr puede formar complejos con pRb para estabilizar su conformación activa y bloquear la progresión del ciclo celular [158], [277], [278].

P53 regula la transcripción de p21Cip1 [327], así como la transcripción de genes implicados en la glucólisis, la lipogénesis y otras vías metabólicas [328]. P53 también está involucrado en la prevención de la poliploidía de células maduras [301], [329] y, en particular, la deficiencia de Ahr mantiene un fenotipo diploide indiferenciado en el hígado adulto con regulación positiva de P53 [133]. Dado que la diploidía está asociada con un estado proliferativo (no diferenciado) en el hígado, los niveles más altos de P53 encontrados en ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> tras una HPx pueden contribuir al aumento de las tasas regenerativas encontradas en estos ratones.

La entrada en el ciclo celular se produce gracias a la inflamación aguda mediada por el sistema inmune innato que se desencadena tras la cirugía del hígado [303]. Las células de *Kupffer* (KC), subpoblación de macrófagos residentes del hígado, secretan TNF- $\alpha$  y IL6 en la etapa de inicio de la regeneración o “*priming phase*” [210], [330], los cuales inducen directamente la expresión de múltiples genes asociados con proteínas de fase aguda para facilitar la proliferación de hepatocitos [206]. La importancia de Ahr en la regulación del sistema inmune está comenzando a surgir, como muestran estudios recientes que describen la limitación de la respuesta de los macrófagos frente a estímulos inflamatorios

## 1.5. DISCUSIÓN I

---

dependiente de la activación de Ahr [254]. Los ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> presentan mayores niveles de inflamación tras la HPx, presentando mayores niveles de TNF $\alpha$  e IL6 liberados en suero y mayor nivel de expresión génica. Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina revelaron que en ratones silvestres sometidos a HPx existía una regulación transcripcional en los promotores de TNF $\alpha$ , Il1 e Il6 por parte de Ahr. Para corroborar esta respuesta, analizamos si había una mayor activación de NF- $\kappa$ B y de la transcripción de genes relacionados con la proliferación de los hepatocitos (*c-Myc*, *c-Jun* y *Stat3*). Ambas respuestas en los ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> presentaban mayor activación que en ratones *Ahr*<sup>+/+</sup>. En células de cáncer de mama humano, Ahr activado forma complejos con RelA y mediante la unión al promotor de *c-Myc* controla su expresión [331]. La formación de complejos Ahr-RelA también puede ayudar a explicar algunos de los resultados toxicológicos adversos de los ligandos Ahr como inmunosupresión, involución tímica, hiperqueratosis y carcinogénesis [279]. De acuerdo con esto, en ratones envejecidos Ahr regula transcripcionalmente la expresión de los genes relacionados con senescencia, p16Ink4a, p21Cip1, y TNF $\alpha$ . Además, estos ratones senescentes carentes de la expresión de Ahr presentan mayores niveles de inflamación y expresión de estos marcadores de senescencia [166].

En general, se acepta que la regeneración del hígado en respuesta a tóxicos se debe a la contribución de las células madre progenitoras del hígado [326]. Sin embargo, la regeneración del hígado tras una HPx no depende necesariamente de las células madre del hígado, aunque pueden inducirse y expandirse bajo circunstancias experimentales específicas [231]. La regeneración acelerada en ratones con Ahr delecionado podría deberse a la activación y expansión de las células con fenotipo *stem* residentes en el hígado, ya que en condiciones basales y tras la HPx, encontramos mayor porcentaje de estas células en ratones *knock-out* que en los ratones silvestres. Esta capacidad de troncalidad o *stemness* que define el hígado *Ahr*<sup>-/-</sup> podría deberse a que el tejido en estado basal ya mostraba sobreexpresión de marcadores de pluripotencia y reprogramación como son Oct4, Nanog, Klf4 y Sox2, y tras la HPx se produjo una mayor inducción de su expresión respecto a la encontrada en el tejido hepático de ratones *Ahr*<sup>+/+</sup>. En carcinomas hepatocelulares también se ha identificado a los marcadores de pluripotencia

y reprogramación como intermediarios capaces de mantener las propiedades de las células madre tumorales [332]-[334]. Diversos trabajos de nuestro grupo han demostrado que Ahr es determinante en el estado de diferenciación en diferentes contextos. En respuestas fisiológicas, Ahr es clave en el desarrollo folicular ovárico [136] y el desarrollo embrionario preimplantacional [40]. En contextos patológicos, Ahr determina el estado de diferenciación de las células de carcinoma embrionario humano [39], en la regeneración del hígado y el pulmón en respuesta a daño agudo inducido por tóxicos [150], [151] e incluso durante el desarrollo de adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas (*Non Small-Cell Lung Cancer*, NSCLC) inducido por el oncogén humano KRas-G12D en un fondo deficiente en Ahr [167].

La ruta *Hippo* es una red de señalización relevante en la regeneración del hígado. Parece probable una interacción funcional entre Hippo y Ahr en el hígado, ya que su intermediario transcripcional Yap, se induce, fosforila y localiza en el citosol en mayor medida en ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> que en ratones *Ahr*<sup>+/+</sup>, lo que sugiere que Ahr limita el nivel de activación de la ruta tras la regeneración inducida por una HPx. Consistentemente, las quinasas responsables de la localización citosólica de Yap y Taz, *Lats1* y *Lats2*, también aumentaron en ausencia de Ahr. Sugerimos que en los hígados sin Ahr, la activación de la vía *Hippo* contribuye a mantener un fenotipo más indiferenciado y, en última instancia, mejora la capacidad de regeneración. Del mismo modo ocurre en blastocistos *Ahr*<sup>-/-</sup> donde YAP no se localiza nuclearmente provocando fallos en la polaridad del embrión [40]. El estudio de la ruta *Hippo* en el hígado es controvertido debido al hecho de que ratones mutantes para diferentes genes de la ruta presentan siempre hígados de mayor tamaño. Algunos de estos modelos *Knock-out* de genes implicados en mantener la ruta activa en el citoplasma presentan mayores tasas proliferativas de los hepatocitos, mientras que en otros son las células troncales las que proliferan y se diferencian [335]-[337].

La señalización *Wnt*/ $\beta$ -*catenina* es responsable de la proliferación de células hepáticas normales y tumorales, debido a la regulación de marcadores de pluripotencia [261]. La regulación de la señalización de  $\beta$ -*catenina* dependiente de Ahr se apoya en el hecho de que en ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> durante la regeneración aumentaron

## 1.5. DISCUSIÓN I

---

su expresión nuclear y, por lo tanto, también aumentó la expresión génica de una de sus dianas transcripcionales, *Axin2*. Por tanto, la activación de Ahr podría afectar a la señalización *Wnt/β-catenina* como ocurre en la regeneración tisular del pez cebra [287].

La regeneración del hígado implica adaptaciones metabólicas; en las primeras etapas la vía de obtención de la energía cambia a la lipólisis mientras que en las etapas tardías la glucólisis empieza a ser la ruta principal de obtención de energía en el hígado [338]. La concentración de glucosa en sangre disminuyó en mayor medida en ratones *Ahr*<sup>-/-</sup>, lo que podría deberse a que presentaban mayor expresión del transportador de glucosa específico del hígado Glut2 (gen *Slc2a2*) ya en estado basal. Además, en el hígado de ratones carentes de Ahr en estado basal se apreciaba un incrementado metabolismo glicolítico, pues la actividad enzimática de la hexoquinasa y la expresión génica de la enzima *Pdk2* era superior al de ratones silvestres. Además, tras la HPx, la expresión génica de *Pdk2* y *Gck* comenzó a recuperarse antes en ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> que en *Ahr*<sup>+/+</sup>. En este sentido, AKT aumentó su expresión proteica y su fosforilación en ratones nulos para Ahr respecto a los ratones silvestres, lo que es un indicativo de la restauración temprana de las vías metabólicas hepáticas dependientes de glucosa. El mantenimiento de la actividad de la hexoquinasa en hígados *Ahr*<sup>-/-</sup> poco después de la HPx podría deberse a la expansión de las células madre con un metabolismo glicolítico preferencial [339]. Un estudio anterior ha descrito la presencia de esteatosis hepática en ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> posnatales [297]. Los genes involucrados en el metabolismo de los lípidos como *Pxr*, *Fae*, *Cd36* y *Pparβ* mostraron niveles de expresión más altos antes y tras una HPx en ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> mientras que *Pparα* mostró un patrón opuesto aumentando en hígados *Ahr*<sup>+/+</sup>. PPAR $\alpha$  es un diana terapéutica frente a la resistencia a insulina [340], mientras que PPAR $\beta$  actúa frente a la inflamación provocada por los macrófagos [341]. Así estos resultados pueden explicarse pues la inflamación de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> tras la HPx era elevada y la ausencia de Ahr afecta al eje de señalización PI3K/AKT/INSR/GSK3 $\beta$ /ERK disminuyendo la resistencia a insulina en el hígado [133].

El trasplante hepático es de las pocas estrategias terapéuticas que ha mostrado resultados prometedores en la mejora de la supervivencia de los pacientes con



insuficiencia hepática. Como aproximación a esta técnica, empleamos trasplante de células sin Ahr en un individuo silvestre sometido a la cirugía de hepatectomía, tratando de confirmar que la ausencia de Ahr mejora la regeneración. Estudios previos que utilizaron este modelo confirmaron que los hepatocitos trasplantados a través del bazo de rata conservan sus características histológicas, ultraestructurales y funcionales, y responden a HGF aumentando la masa de las células trasplantadas [342]-[344]. Se ha confirmado que el trasplante mejora la capacidad funcional del hígado cirrótico en ratas [345] y en perros [346]. De este modo, el trasplante de células podría emplearse para mejorar la función hepática en los pacientes con hepatopatía crónica no candidatos a trasplante hepático, o en aquellos enfermos que sí son candidatos al trasplante, para mejorar la función hepática previa al trasplante o durante los períodos de espera para un retrasplante.

En resumen, la actividad fisiológica de Ahr podría ser necesaria para el inicio y la finalización adecuados de las respuestas proliferativas que impulsan la regeneración del hígado. Ahr tiene relevancia en el control de la diferenciación, y además se relaciona con las vías de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina e Hippo, las cuales promueven regeneración y están asociadas a la activación de factores de pluripotencia y reprogramación. Una cuestión relevante es que a pesar de que, tras la HPx, la regeneración del tejido no se produzca esencial y necesariamente por la expansión de células con fenotipo *stem*, en ausencia de Ahr tras este procedimiento aumenta su proporción e indiferenciación. Se requerirá trabajo futuro para determinar si la modulación farmacológica de Ahr representa una estrategia prometedora para acelerar la regeneración hepática en pacientes con diferentes formas de daño hepático, incluida la hepatectomía parcial dependiente del cáncer.

## 1.5. DISCUSIÓN I

---

## 1.6. Conclusiones I / Conclusions I

### Conclusiones I:

1. Ahr retrasa la regeneración hepática tras una HPx en el hígado. El receptor se activa e induce su expresión de manera independiente de ligando exógeno durante el proceso para inactivarse una vez llevada a cabo la reparación.
2. La regeneración más eficiente observada en hígados de ratones carentes de Ahr se correlaciona probablemente con una respuesta inflamatoria acrecentada al principio de la regeneración, provocando mayores tasas proliferativas hepatocíticas.
3. La deficiencia de Ahr aumenta el porcentaje de células con un fenotipo de célula madre en hígados en condiciones basales y tras la HPx, lo que es coherente con el aumento de expresión de marcadores de pluripotencia e indiferenciación en esta población celular.
4. La activación persistente de Ahr podría conducir a la regulación negativa de las rutas de señalización *Hippo/YAP* y *Wnt/ $\beta$ -catenina*, alterando así la diferenciación y/o el estado proliferativo del hígado.
5. El aumento de la capacidad de regeneración del hígado de ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> podría deberse a la activación del metabolismo lipídico y glicolítico de estos ratones.
6. El trasplante de células *Ahr*<sup>-/-</sup> incrementa la tasa regenerativa hepática de ratones silvestres que han sufrido una HPx.

## 1.6. CONCLUSIONES I / CONCLUSIONS I

---

### Conclusions I:

1. Ahr delays hepatic regeneration after PHx in the liver. The receptor is activated and induced independently of exogenous ligand during the process to come back at basal levels once the repair has been achieved.
2. The more efficient regeneration observed in Ahr knockout mouse livers probably correlates with an enhanced inflammatory response early in the regeneration process, leading to higher hepatocyte proliferative rates.
3. Ahr deficiency increases the percentage of cells with a stem cell phenotype in livers in basal conditions and after PHx, which is consistent with the increased expression of pluripotency and undifferentiation markers in this cell population.
4. Persistent activation of Ahr could lead to negative regulation of the Hippo/YAP and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways, thus impairing the differentiation and/or proliferative state of the liver.
5. The increase in the regenerative capacity of the *Ahr*<sup>-/-</sup> liver could be due to the improvement in the lipid and glycolytic metabolism of these mice.
6. *Ahr*<sup>-/-</sup> cell transplantation increases the hepatic regenerative rate of wild-type mice that have been surgered with a PHx.

## 1.6. CONCLUSIONES I / CONCLUSIONS I

---

# Capítulo 2

## Implicación del receptor de aril hidrocarburos Ahr en la Esclerosis Múltiple

### 2.1. Resumen II / Summary II

**Resumen II:** Las células dendríticas (*Dendritic cells*, DC, DC) actúan como conexión entre la fase innata y adaptativa del sistema inmune. En el contexto de las enfermedades autoinmunes, las DC regulan el equilibrio entre los mecanismos inmunes patogénicos y reguladores, controlando el inicio y la progresión de la enfermedad. Así parecen tener un rol relevante en la EM (Esclerosis Múltiple), enfermedad autoinmune del SNC (Sistema Nervioso Central) que se caracteriza por una patente desmielinización y daño axonal. El receptor de hidrocarburos de arilo (AHR) es fundamental para el desarrollo y la homeostasis del sistema inmune. En esta Tesis Doctoral, se utilizó como modelo la Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE) con un enfoque clínicamente relevante para el desarrollo de tratamientos inmunomodulares. De hecho, AHR modula la funcional de las DC a

## 2.1. RESUMEN II / SUMMARY II

---

través de la regulación de la expresión de genes responsables de la diferenciación de Treg (células T reguladoras), modulando rutas celulares responsables de este fenotipo como son las controladas por CD39 o FADS3. Los ligandos endógenos de AHR provenientes de la microbiota intestinal, y concretamente el ácido indolacético (IAA) pueden modular las respuestas en las DC orientándolas hacia la diferenciación de células T tolerogénicas. Así debido a la importancia de la microbiota en el eje intestino-cerebro en las enfermedades autoinmunes, encontramos que el tratamiento con probióticos productores de este metabolito disminuye la patogenicidad de la EAE principalmente a través de la expansión de las células Treg frente a las células TH17 en el SNC debido a una modulación de las DC en el entorno periférico antes de alcanzar el SNC. El desarrollo de tratamientos que modulen la señalización de AHR en DC puede ser una estrategia terapéutica prometedora para tratar la EM.



**Summary II:** Dendritic cells (DC) act as a connection between the innate and adaptive phase of the immune system. In the context of autoimmune diseases, DCs regulate the balance between pathogenic and regulatory immune mechanisms, controlling the initiation and progression of the disease. Thus, they seem to play a relevant role in MS (Multiple Sclerosis), an autoimmune disease of the CNS characterized by patent demyelination and axonal damage. The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is essential for the development and homeostasis of the immune system. In this work, Experimental Autoimmune Encephalitis (EAE) was used as a model with a clinically relevant approach for the development of immunomodulatory treatments. In fact, AHR modulates the functionality of DCs through the regulation of the expression of responsible genes for Treg cells differentiation, modulating cellular pathways to get this phenotype, such as those controlled by CD39 or FADS3. Endogenous AHR ligands from the intestinal microbiota, specifically indoleacetic acid (IAA), can modulate responses in DCs, directing them towards the differentiation of tolerogenic T cells. Thus, due to the importance of the microbiota in the gut-brain axis in autoimmune diseases, we found out that treatment with probiotics which produce this metabolite reduces the pathogenesis of EAE mainly through the expansion of Tregs cells against TH17s cells in the CNS, due to a modulation of DCs in the peripheral environment before reaching the CNS. Developing treatments that modulate AHR signalling in DC may be a promising therapeutic strategy to treat patient with MS.

## 2.1. RESUMEN II / SUMMARY II

---

## 2.2. Introducción II

### 2.2.1. Las células dendríticas

El sistema inmune es una compleja red de células, tejidos y órganos cuya función principal es la protección frente a infecciones y daños producidos por agentes físicos o químicos de diversa índole, logrando así la homeostasis del organismo. En el sistema inmune se diferencian dos componentes: el sistema inmune innato y el adaptativo. El sistema inmune innato lo componen las células fagocitarias, las cuales son responsables de la respuesta inmune inicial al acumularse en los focos inflamatorios. A continuación, capturan antígenos para dar lugar a la fase adaptativa de la respuesta inmune. Así en esta conexión entre la fase innata y la adaptativa tienen un papel esencial las células dendríticas (DC) y los macrófagos ( $M\phi$ ), además de las citoquinas que liberan por su capacidad para polarizar la respuesta inmune.

Las células dendríticas (DC) recibieron su nombre de la palabra árbol en griego, *dendron*. Su nombre se debe a su morfología estrellada definida por un citoplasma granular y prolongaciones de la membrana externa a modo de largos seudópodos. El hecho de poseer esta morfología tan característica les permiten tener una gran capacidad para la captación, procesamiento, transporte y presentación de antígenos [347], [348]. Por ello, las DC son las células presentadoras de antígeno (CPA) por excelencia, pues en la respuesta inmune primaria presentan a las células T vírgenes epítomos derivados de antígenos gracias a la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II [349], [350]. El proceso de maduración de las DC implica la pérdida de su capacidad de adherencia y fagocitaria, adquisición de motilidad, translocación a la membrana plasmática de moléculas MHC de clase II, secreción de citoquinas y migración hacia los ganglios linfáticos.

Es importante recordar que el proceso de captación de antígenos se realiza mediante moléculas denominadas receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern Recognition Receptor*, PRR) que se expresan en el citoplasma de las células presentadoras de antígenos. Estos receptores reconocen estructuras de los microorganismos conservadas a lo largo del proceso evolutivo que se denomi-

## 2.2. INTRODUCCIÓN II

---

nan patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMP) y también estructuras generadas durante el daño tisular denominadas patrones moleculares asociado a daño (*Danger Associated Molecular Patterns*, DAMP). La interacción de los PAMPs con su PRR es fundamental para la discriminación entre lo propio y no propio, y el progreso de la inmunidad adaptativa. Por tanto, las DC presentan un rol fundamental en el control de la respuesta inmune en los órganos linfáticos secundarios en un proceso que consta de tres etapas [351]-[353]:

- Fase de reconocimiento: las DC presentan antígenos a los linfocitos T con los que interactúan por medio de receptores específicos.
- Fase de activación y proliferación: una vez que los linfocitos T reconocen antígenos específicos y gracias a la participación de señales coestimuladoras (presentes en las DC), se producen cambios moleculares que activan a estas células.
- Fase efectora: según el tipo de agente invasor, el sistema inmune genera una respuesta humoral o celular para eliminarlo.

Las DC constituyen una población celular heterogénea que según sus características morfológicas y funciones pueden clasificarse en DC clásicas (cDC) y DC plasmocitoides (pDC). Ambos tipos se diferencian a partir de una misma célula progenitora localizada en la médula ósea dependiente de Flt3 [354]-[358]. Sin embargo, la diferenciación de cada subconjunto está determinada por diferentes factores de transcripción. Las cDC son más complejas y diversas que las pDC, con mayor capacidad de fagocitosis y presentación de antígenos. Las DCc se subclasifican en cDC1 y cDC2 en ratones y humanos, con programas transcripcionales específicos asociados a cada subconjunto. La expresión de dichos marcadores depende del microambiente y del estado de maduración de las DC. Sin embargo, la expresión de *Zbtb46* es común a cDC1 y cDC2 [359].

Sin embargo, las DC también se diferencian entre sí al expresar distintos PPR, que definirán sus capacidades para reconocer y responder a diferentes estímulos

[360], [361]. Sin embargo, las DC también son una población celular altamente adaptable al contexto y modifican fácilmente su perfil transcripcional para provocar la respuesta adecuada de las células T CD4+ (**Figura 2.1**). Así, varios factores determinan la regulación del programa de diferenciación de células Th, como son la fuerza y la duración de las interacciones coestimuladoras y péptido-MHCII-TCR [362]. En condiciones homeostáticas, las señales procedentes del propio organismo probablemente desempeñen un papel fundamental en que predomine un estado tolerogénico frente a inmunogénico en DC [363], como se demostró recientemente en el tracto intestinal [364]. Durante la infección o las respuestas inflamatorias, las DC impulsan la diferenciación de las células T efectoras (Teffs) que combaten los patógenos, pero la actividad desregulada de las Teffs puede provocar inmunopatología y trastornos autoinmunitarios. En consecuencia, no sorprende que las DC también promuevan el desarrollo de células T reguladoras (Tregs) que suprimen las respuestas inmunitarias dañinas. Por lo tanto, las DC juegan un papel central en el control de la respuesta de las células T, proporcionando un objetivo atractivo para la inmunoterapia.

### 2.2.1.1. Rol de CD39 en células dendríticas

El conocimiento derivado de extensos estudios genéticos, bioquímicos, farmacológicos e inmunológicos llevados a cabo sobre la enzima CD39 (codificada por el gen ENTPD1), ha revelado su potencial efecto inmunosupresor [366]-[372]. El ATP es ampliamente conocido como la moneda energética por excelencia dentro de la célula. Sin embargo, el ATP también puede ser liberado al medio extracelular (eATP) por las células ante un estrés severo como pueden ser daños de diversa índole o por células apoptóticas, proporcionando señales inflamatorias críticas para una eficaz respuesta inmune innata y adaptativa [373]. La hidrólisis del eATP en adenosina extracelular (Ado) se produce por la acción coordinada de CD39 y CD73. En esta secuencia de eventos, la ectoenzima CD39 degrada ATP en ADP y AMP, y CD73 cataliza el último paso que conduce a la producción de Ado [374], [375].

El eATP se une a receptores P2, los cuáles se pueden clasificar en los subtipos P2X y P2Y. El prototipo de receptor de ATP y el más estudiado es el P2X7;

## 2.2. INTRODUCCIÓN II

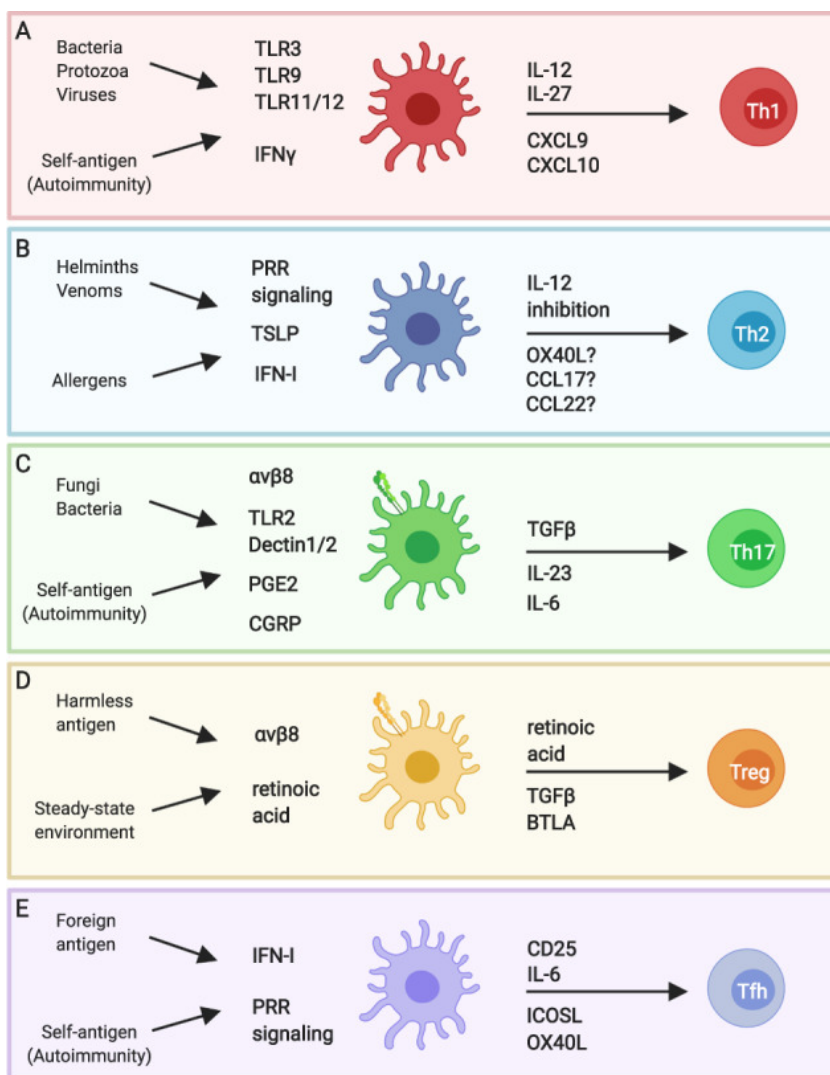


Figura 2.1: La plasticidad transcripcional de las células dendríticas determina la diferenciación de células T CD4 $^{+}$  in vivo. Así se asegura la activación del fenotipo de células Th efectoras apropiadas [365].

se sabe que eATP al unirse a este receptor aumenta la activación de las células T [376], [377] e interfiere con la diferenciación, la función y la estabilidad de las células Treg [378]-[380]. Además, la ruta más importante desencadenada por los receptores P2X7 implica la activación del inflamasoma NLRP3, lo que lleva a su vez conlleva la activación de la caspasa-1, y ésta fomenta la liberación de interleuquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  y IL-18) [381]. Pero se han descrito muchos más efectos de la señalización inducida por ATP en los leucocitos como la liberación de IL-6, TNF $\alpha$ , prostaglandina, CXCL8, CCL2, CCL3 y metaloproteínasa 9 [382].

Ado, el producto de degradación del eATP, actúa con efecto antiinflamatorio, ya que regula negativamente las funciones de las células dendríticas (DC). Las DC expresan CD39 y/o CD73, así como el receptor de Ado (AdoR). Los receptores AdoR pertenecen al grupo de receptores acoplados a proteína G (GPCR), que conducen a la activación de la Adenilato Ciclasa (AC) y en último término, al aumento de los niveles de AMP cíclico (cAMP). La actividad elevada de la AC se relaciona con la señalización de la proteína quinasa A (*Protein Kinase A*, PKA). PKA modula diferentes rutas de señalización responsables del fenotipo inmunocomprometido y tolerogénico: (1) suprime la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-12 y TNF $\alpha$  por parte de las DC y macrófagos [383], (2) media la translocación nuclear del coactivador de transcripción 3 regulado por CREB (CRTC3) provocando la regulación positiva de la transcripción del gen IL-10 [384], [385] y (3) a través del eje EPAC-RAP-PKA se forman agregados DC-Treg los cuales liberan IL-10, moléculas inhibitoras de las células T y disminuyen la expresión del CMHII [386]-[388]. No obstante, la expresión de ciertos receptores AdoR se correlacionan con el estado de maduración de las DC [389], [390]. De esta forma, la expresión diferencial de AdoR por parte de las DC sirve para regular los procesos inflamatorios: al principio de una agresión las DC inmaduras se vuelven activas y se reclutan en el sitio inflamatorio [391]. Pero, tras esta acción, maduran y desencadenan efectos inhibidores de la inflamación [392].

Como recapitulación se puede asumir que las DC pueden expresar tanto los AdoR, las ectonucleotidasas CD39/CD73, como los receptores P2X7. Por ello desentrañar los efectos del eATP y Ado en estas células puede ser algo controvertido

## 2.2. INTRODUCCIÓN II

---

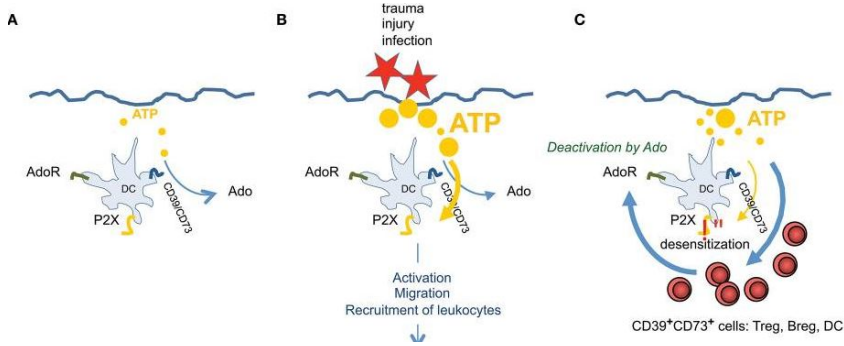
[393]. No obstante, en un esquema simplificado en condiciones no inflamatorias, las DC en estado “estacionario” patrullan a través de diferentes tejidos [394], [395] y detectan pequeñas cantidades de ATP. El ATP recluta subconjuntos de DC periféricas inmaduras [392], [396] y se inicia una respuesta inmunitaria. Pero los mecanismos contrarreguladores se inician al mismo tiempo. Por ejemplo, los receptores P2X7 se vuelven refractarios a la estimulación repetida por altas concentraciones de ATP [374], lo que hace que las DC sean insensibles a la activación mediada por ATP [392]. Además, el reclutamiento de células T reguladoras a los sitios inflamatorios, que expresan altos niveles de CD39 y CD73, acelera la degradación de ATP a Ado [397], [398]. Así que la balanza se inclina hacia un ambiente enriquecido con Ado que ejerce progresivamente funciones antiinflamatorias. Solo cuando la infección, el crecimiento tumoral o el trauma conducen a niveles elevados de eATP, prevalecen las propiedades activadoras, a pesar de que también se expresan los receptores Ado. Por tanto, las DC son clave para modular la homeostasis y la inflamación, y se requieren ambos tipos de receptores (para ATP y Ado) para controlar el grado de supresión o activación inmunitaria (**Figura 2.2**).

### 2.2.1.2. Efecto del ácido docosahexaenoico en las células dendríticas

Una dieta sana y equilibrada es fundamental para el buen funcionamiento del organismo, incluso para el sistema inmunitario. Además, se ha descubierto que algunos factores dietéticos tienen propiedades inmunorreguladoras, tanto micronutrientes (vitamina D) como macronutrientes (ácidos grasos) [400]. El impacto de los ácidos grasos poliinsaturados (*Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFA) en el sistema inmune se ha investigado durante décadas, con especial énfasis en los ácidos grasos poliinsaturados omega-3, el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). ALA se encuentra en nueces y semillas, mientras que EPA y DHA son los principales componentes del aceite de pescado [401], [402].

Aunque los mecanismos de acción específicos de los PUFA dependen del tipo celular, cabe destacar que son incorporados de manera efectiva al interior de todas las células inmunitarias investigadas hasta la fecha [403]-[405], ya que no





**Figura 2.2: ATP y Ado están involucrados en la regulación de la inflamación de los tejidos.** (A) En estado basal sólo están presentes cantidades traza de ATP. (B) Después de una lesión, se liberan grandes cantidades de ATP, que no pueden degradarse y anulan la producción de Ado. Esto estimula las DC a través de los receptores P2X7, lo que conduce a la activación, la migración y el reclutamiento de diferentes subconjuntos de leucocitos. (C) Cuando continúa la infección, entran más leucocitos que expresan CD39/CD73 en el tejido, el ATP se degrada a Ado, que ahora prevalece y termina las funciones efectoras de varias células inmunitarias. Por lo tanto, se restablece la homeostasis inmune [399].

pueden acumularse en las membranas celulares como lo hacen los ácidos grasos saturados debido a su estructura química. Así numerosos estudios avalan los efectos de los PUFA en diferentes células y contextos inmunes [406], e incluso su efecto clínico en enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario [407]-[410]. Concretamente, en las células dendríticas tanto de ratón como de humano, el DHA afecta a su función principal de presentación de antígenos, pues reduce la expresión del CMHII [411]-[414]. Como consecuencia, la activación de las células T por las células dendríticas tratadas con ácidos grasos omega-3 se ve agravada notablemente, reduciendo su proliferación manteniendo un fenotipo inmaduro, aunque incrementando la proporción de células T Foxp3 positivas [412], [413], [415], [416].

Recientemente se ha descrito en humanos la genética del grupo las desaturasas de los ácidos grasos, FADS [417]. Este grupo incluye los genes FADS1 y FADS2

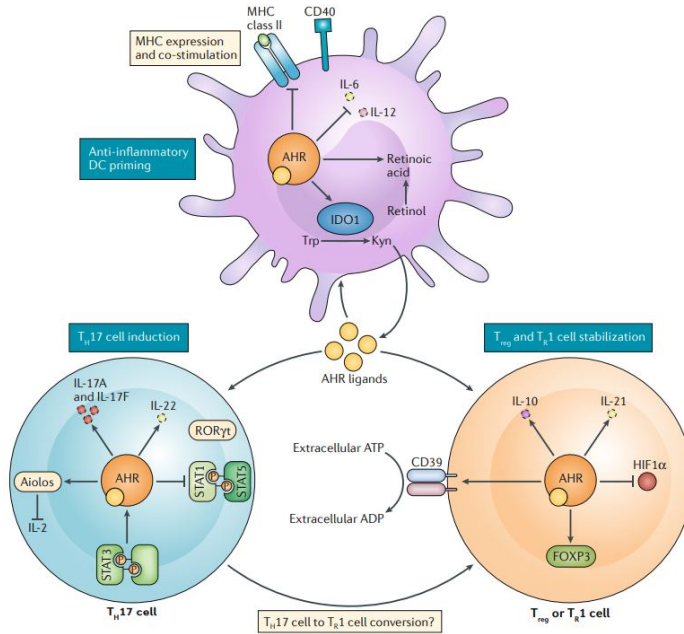
## 2.2. INTRODUCCIÓN II

---

que codifican para las desaturasas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados. A un tercer gen, FADS3, no se le ha atribuido ningún papel funcional. Aunque existe una correlación significativa entre el polimorfismo FADS3 y los marcadores del metabolismo de los PUFA, el colesterol de lipoproteínas de alta o baja densidad y los niveles de triglicéridos [418]-[421]. Un estudio corroboró que FADS3 mostraba diferentes isoformas expresadas diferencialmente en tejidos procedentes de rata, ratón y humano [422], por ejemplo estaba altamente expresado en el sitio de implantación del embrión en el útero de ratón [423] y regulado a la baja durante la diferenciación neurogénica humana [424]. Posteriormente, se generó un ratón *Fads3*<sup>-/-</sup> con el objetivo de esclarecer la función metabólica *in vivo* de esta proteína, los cuáles mostraban menor nivel de DHA en el cerebro tras el nacimiento [425]. Esta revelación tiene gran importancia debido a que el DHA es fundamental para el correcto desarrollo neuronal [426]-[428], constituyendo el 8% del peso seco del cerebro [429].

### 2.2.1.3. AHR en células dendríticas

Gracias a los estudios que emplearon cepas de ratones mutantes para Ahr, se revelaron importantes funciones del receptor en los sistemas inmune innato y adaptativo [430]-[432]. Un ejemplo lo constituyen las DC, las cuales son fundamentales para orquestar la conexión entre ambos sistemas (**Figura 2.3**). La presencia de las DC es elevada en órganos con elevada exposición a agentes externos (patógenos o no) como la piel, los pulmones y el intestino. Muchos de estos compuestos pueden actuar como ligandos de AHR y, por lo tanto, las DC están expuestas a ellos constantemente [433]. La delección de Ahr en DC de ratón no afectó a su desarrollo *in vivo* o su diferenciación *in vitro* a partir de progenitores de la médula ósea [434], [435]. No obstante, este silenciamiento de Ahr provocó alteraciones en el epitelio intestinal traducándose en el aumento de los niveles de inflamación en un modelo murino de colitis [434], y en pulmón con mayor activación de células T y aumento de las respuestas alérgicas proinflamatorias [436]. Otros estudios revelaron la importancia de AHR en las DC derivadas de médula ósea, pues su maduración con LPS y CpG aumentan la expresión de Ahr [435]. Además, puede ser responsable de la diferenciación de monocitos en DC, al



**Figura 2.3: La activación del receptor de hidrocarburo de arilo (AHR) tiene múltiples efectos en DC y células T.** En las DC, AHR amortigua la inducción de citoquinas que promueven la polarización de subconjuntos de células T patógenas y reduce la expresión de MHC de clase II. AHR induce la generación de sus ligandos a través de un circuito de alimentación positiva que involucra IDO1. Además, AHR tiene múltiples efectos en las células T [438].

interactuar con los factores de transcripción responsables de este proceso [437].

Principalmente a AHR se le han atribuido efectos antiinflamatorios, aunque esta afirmación hay que tomarla con cautela, pues la regulación del receptor puede variar según el contexto y/o ligando de unión [439], y de igual modo, podría ocurrir entre las diferentes poblaciones de DCs. Pero las evidencias encontradas hasta el momento sostienen que AHR puede modular la función de las DC de forma directa (**Tabla 2.1**) o indirecta atendiendo a diferentes mecanismos y provocando: maduración, polarización de células T regulando la producción de citoquinas, expansión de células T reguladoras y/o inhibición de células T proin-

## 2.2. INTRODUCCIÓN II

---

flamatorias, control de los niveles de proteínas esenciales en la función dendrítica como el CD11c, CMHII, CD25 o CD86 [436], [440], [441] o de otras proteínas inmunomoduladoras como las enzimas IDO1/2 responsables de la producción de metabolitos inmunosupresores como la kinurenina [435], [441], [442].

**Tabla 2.1: Efecto de la activación de AHR por diversos ligandos exógenos en DC.** Indirubin-3'-oxime (IO); Partículas ambientales hidrocarburos aromáticos policíclicos, dioxinas y bifenilos policlorados (PM); StemRegenin 1 (SR1); indol-3-carbinol (I3C); éster metílico del ácido 2-(1H-indol-3-ilcarbonil)-4-tiazolcarboxílico (ITE); indoxyl 3-sulfate (I3S); kinurenina (Kyn).

Ligando	Consecuencia funcional
Kyn (agonista (e))	Modifica diferencialmente la expresión de citoquinas en DC derivadas de monocitos humanos (también TCDD, FICZ, I3C) [443]; producción alterada de citoquinas en respuesta a la infección por Herpesvirus [444]; sesgó la diferenciación de las células T en Treg [445].
I3C (agonista (e))	Diferenciación de monocitos en DC (también FICZ) [437].
I3S (agonista (e))	Inhibieron el desarrollo de pDC derivados de precursores de médula ósea (igual efecto con I3C) [446].
ITE (agonista (e))	Restaura las CPA en la piel infectada por VPH [444]; indujo la secreción de IL-10 e inhibió la producción de IL-1 $\beta$ e IL-6 en DC en un modelo de rinitis alérgica [447]; disminuye la expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras CD86 y CD103 [441].
FICZ (agonista (E))	Inhibe la proliferación de células T [436].

Ligando	Consecuencia funcional
VAF347 (agonista (E))	<p>(1) Mejora de la tolerancia del aloinjerto de islotes pancreáticos [430]; (2) la inhibición de la inflamación pulmonar alérgica [432], [448]; y (3) efectos antiinflamatorios en DC derivadas de monocitos humanos al mantener las células precursoras de las DC indiferenciadas en una etapa temprana e inhibir la patogenicidad de células Th17 [449], [450].</p>
SR1 (antagonista (E))	<p>Expande las células progenitoras CD34 humanas e induce su diferenciación en DC convencionales y plasmocitoides, lo que les permite activar a las células T proinflamatorias [451]; y decrece la diferenciación de los monocitos en DC [437].</p>
TCCD (agonista (E))	<p>Aumentó la expresión de CD86 y CD54, al tiempo que disminuyó la frecuencia de las DC esplénicas y provocando efectos proinflamatorios [452]; alteraciones en el desarrollo y la diferenciación de los timocitos provocando atrofia tímica [453]; altera la función de la DC pulmonares y su tráfico a los nódulos linfáticos durante la infección del virus de la gripe [454]; la respuesta proliferativa y la producción de IL-2, IL12 e IFN-<math>\gamma</math> por parte de las células T aumentaron pero DC se eliminaron prematuramente [455].</p>
PM (agonista (E))	<p>Indujo interleucina (IL)-1<math>\beta</math>, CD80, CD86 y MHC clase II, lo que sugiere una mayor activación de DC, coestimulación y presentación de antígenos [456].</p>
IO (agonista (E))	<p>Suprimió la producción de TNF<math>\alpha</math>, IL1<math>\beta</math>, IL6, IL12 y óxido nítrico, pero aumentó los niveles de IL-10 (al igual que I3C) [457].</p>

## 2.2. INTRODUCCIÓN II

---

Por todo ello, es probable que una combinación de efectos específicos del ligando junto con señales concretas del tejido, den como resultado respuestas determinadas moduladas por AHR y apropiadas para controlar la inflamación en el microambiente local. Las DC tienen un papel central en el control de las respuestas de las células T y la regulación de la tolerancia inmunológica [458]. Así conocer la señalización mediada por AHR en DC podría suponer un gran avance en tratamientos de inmunoterapia en multitud de patologías de diversa índole.

### 2.2.2. La esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante, crónica y multifocal del sistema nervioso central (SNC). La característica fundamental de la EM es la aparición en cualquier región del SNC, de lesiones inflamatorias que causan desmielinización y daño axonal, expresándose clínicamente de forma muy variada dependiendo de dónde se localicen dichas lesiones [459]. Los síntomas pueden incluir alteraciones sensoriales y visuales; deterioro motor y de coordinación; y espasticidad, fatiga, dolor y déficits cognitivos [460]. Un elevado porcentaje de los pacientes con EM desarrollan la enfermedad de forma remitente-recurrente, que se caracteriza por períodos de exacerbación de los síntomas seguidos de remisión. A medida que la enfermedad evoluciona, la recuperación de los síntomas es incompleta alcanzándose una discapacidad neurológica irreversible, y entonces la enfermedad pasa a denominarse EM secundaria progresiva.

Gracias a estudios epidemiológicos se sabe que la EM es una enfermedad neurológica crónica que afecta a más de 2,5 millones de personas en todo el mundo, siendo la enfermedad más frecuente en adultos jóvenes en Europa y Norteamérica [459]. Además, la EM afecta a las mujeres con el doble de frecuencia que a los hombres [461], [462], pudiendo probablemente esta mayor susceptibilidad estar en relación con factores hormonales [463].

Los numerosos estudios realizados sobre la EM sugieren que esta enfermedad estaría desencadenada por un factor ambiental, como un agente infeccioso que, actuando sobre un individuo con una determinada susceptibilidad genética, desencadenaría una respuesta autoinmune responsable de la lesión del SNC

[464], [465]. La tasa de incidencia de la EM puede variar a lo largo del tiempo, lo que apoyaría la existencia de un factor ambiental [466]. Así por un lado, se ha estudiado la relación de la EM con diferentes enfermedades infecciosas como pueden ser las causadas por el virus herpes simple 6 (VHS-6), el virus de Epstein-Barr (VEB), el virus varicela zóster (VVZ), diferentes especies de *Candida* o la *Chlamydia pneumoniae* [467]-[473]. Los factores ambientales que, con mayor evidencia parecen participar en el riesgo a padecer EM son: reducidos niveles de vitamina D y el tabaquismo. Por otro lado, los estudios genéticos han identificado como principal determinante genético para la EM al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), pues ciertos alelos de la región II del CMH, como el DR2, se asociaban fuertemente con esta patología y podría guardar relación con la capacidad de estas moléculas para presentar antígenos a las células T reactivas [474], [475]. No obstante, en el año 2017 durante el *International Multiple Sclerosis Genetics Consortium* se llegó a la conclusión gracias a los estudios de asociación de genoma completo (*Genome Wide Association Study*, GWAS) de la identificación de más de 50 *loci* diferentes relacionados con el riesgo a padecer EM. Muchas de las variantes alélicas detectadas se localizan en genes con funciones inmunológicas relevantes y la mayoría se asocian con otras enfermedades autoinmunes.

### 2.2.2.1. Mecanismo patogénico

La patogenia de la EM se desconoce, aunque parece ser de índole inmunológica. La primera alusión de la participación del sistema inmune en el desarrollo de esta enfermedad la hizo Elvin Kabat, pues observó que el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con EM contenía una superior cantidad de gammaglobulinas [476]. En estos momentos se reconocen una serie de etapas en el desarrollo de la EM:

**a. Activación periférica de células T patogénicas:** Se acepta que la EM se desencadena por la activación de las células T reactivas del SNC. En algún momento, estas células T autorreactivas son activadas en la periferia por un factor sistémico o local. Se han propuesto dos hipótesis principales para explicar la activación de las células T reactivas del SNC en la EM: (1) reconocimiento

## 2.2. INTRODUCCIÓN II

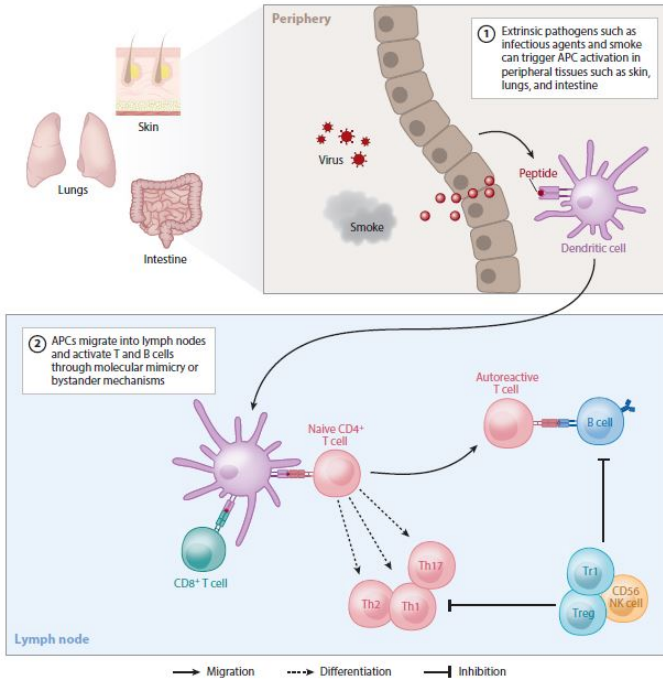
---

de antígenos derivados del SNC que se filtran a los ganglios linfáticos cervicales profundos a través de un mecanismo de mimetismo molecular (epítomos compartidos por el autoantígeno del SNC y los posibles agentes infecciosos) [477], [478], o (2) reactividad cruzada inmunitaria por una estimulación a través de antígenos extraños de procedencia viral o bacteriana al ser capturados por las células presentadoras de antígeno en tejidos como los pulmones, el intestino o la piel [479], [480] (**Figura 2.4**). Independientemente del evento iniciador involucrado, un aspecto importante de la patología de la EM es la propagación del epítomo [481]. En este proceso, la respuesta inmune generada causa daño al propio tejido y los antígenos liberados del tejido dañado son absorbidos, y esto inicia una respuesta autoinmune hacia los autoantígenos. Después de su activación y polarización en subconjuntos proinflamatorios, estas células T autorreactivas migran al SNC para causar el daño tisular responsable de la EM.

Los pacientes con una susceptibilidad genética para la EM poseen células T CD4+ autorreactivas en sangre con especificidad para determinados antígenos presentes en el SNC, entre los que destacan: la proteína básica de la mielina (*Myelin Basic Protein*, MBP), la proteína proteolipídica (*Proteolipid protein*, PLP) y la glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos (*Myelin oligodendrocyte glycoprotein*, MOG) [483], [484]. Aunque también se han descrito otros antígenos no relacionados con la mielina como la proteína astrogliar S100 $\beta$  y las proteínas de shock térmico de 65 y 70 KDa [485], [486].

**b. Migración al sistema nervioso central:** La barrera hematoencefálica del SNC limita el paso de células circulantes y de grandes moléculas, convirtiendo al SNC en un lugar relativamente aislado inmunológicamente. Por lo tanto, las células T autorreactivas tras su activación periférica deberían atravesar esta barrera para causar daño al SNC. Para ello, se precisa la interacción de las moléculas de adhesión expresadas tanto en la superficie de estas células inmunes como en las del endotelio vascular. Además, las células T activadas segregan citoquinas proinflamatorias tales como la IL-1, el TNF $\alpha$  y el INF $\gamma$ , que provocan un aumento en la expresión de estas moléculas de adhesión endotelial: E-selectinas, molécula de adhesión intracelular 1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*, ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*, VCAM-1). Las selec-

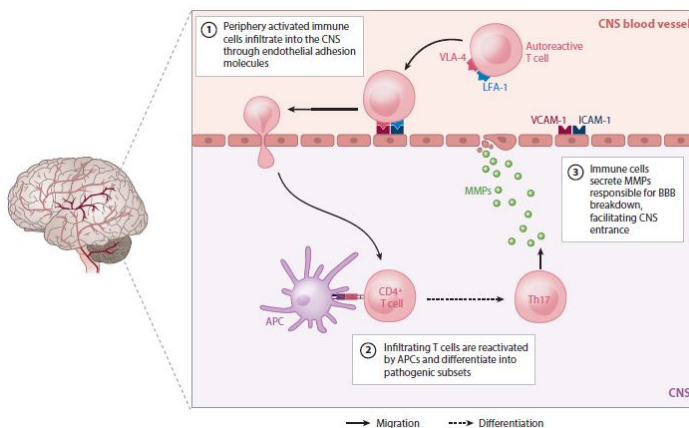




**Figura 2.4:** Las células inmunes autorreactivas se activan en los ganglios linfáticos periféricos después de la presentación de antígenos. Después de su activación, las células T CD4+ pueden migrar al SNC para causar daño tisular [482].

tinias endoteliales establecen enlaces débiles con los ligandos linfocitarios y, junto con las quimioquinas CCL19 y CCL21, producen la ralentización y el rodamiento de los linfocitos sobre la pared vascular en la dirección del flujo sanguíneo. Esta unión permitirá el paso de las células inmunitarias a través del endotelio [487]. Las células T tendrán que atravesar dos membranas basales, lo que llevan a cabo por dos mecanismos: la unión a diversos subtipos de lamininas y la producción linfocitaria de proteasas que degradan la matriz extracelular como las metaloproteinasas de la matriz (MMP): gelatinasa A (MMP-2) y gelatinasa B (MMP-9) [488] (**Figura 2.5**). De hecho, se ha demostrado que las células T autorreactivas no logran migrar al SNC en ratones deficientes en el ligando de VCAM-1 (VLA-4)

## 2.2. INTRODUCCIÓN II



**Figura 2.5:** Las células inmunitarias autorreactivas se extravasan al SNC como resultado de interacciones con moléculas de adhesión y la secreción de MMP. La presentación de antígenos por parte de las células dendríticas, la microglía y otras células del SNC reactiva las células T [482].

[489]. De igual modo, el bloqueo farmacológico de este ligando evita la entrada de linfocitos en el SNC y suprime la actividad de la enfermedad [490]. En conjunto, estos hallazgos sugieren que las interacciones complejas entre el microambiente local de las lesiones del SNC y las células inmunitarias activadas promueven, amplifican y mantienen la inflamación del SNC.

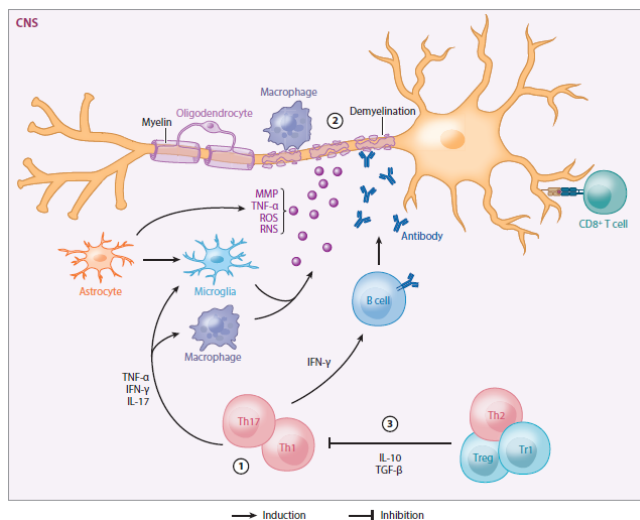
**c. Reactivación de linfocitos y daño tisular:** En el SNC, los linfocitos T CD4+ autorreactivos tienen que ser reestimulados o, por el contrario, mueren o abandonan el SNC. Así, el linfocito activado encontrará a una célula presentadora de antígeno, la cual expresa en su superficie el antígeno causante de la EM presentado por el CMHII [491], [492]. Al ser reestimulados, aquellos linfocitos T de fenotipo *helper* CD4+ tipo 1 (Th1) y 17 (Th17) producen citoquinas proinflamatorias ( $TNF\alpha$ ,  $INF\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-12, IL-17 y GM-CSF) [493]-[495]. Este entorno proinflamatorio produce un incremento de la expresión de moléculas de adhesión endoteliales, aumentando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y permitiendo mayor extravasación de linfocitos y monocitos. Además, con ello se induce la proliferación clonal de las células T y se activan macrófagos,

células dendríticas, astrocitos y microglía. Estas células inmunes son responsables de activar aún más los astrocitos y la microglía residentes, mientras reclutan linfocitos T CD8+ adicionales, linfocitos B y mastocitos que potencian la patología del SNC.

Una vez en el SNC, las células inmunitarias infiltrantes y las células residentes en el cerebro secretan mediadores oligotóxicos y neurotóxicos solubles que incluyen especies reactivas de nitrógeno, óxido nítrico sintasa, glutamato, perforina, granzima, MMP y citocinas inflamatorias [496]-[501]. Además, este entorno proinflamatorio interfiere con la capacidad de los astrocitos, y potencialmente de los oligodendrocitos, para satisfacer las necesidades metabólicas de las neuronas [502], amplificando el daño a las neuronas. Además, los autoanticuerpos secretados por las células B activadas desencadenan la fijación del complemento y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, lo que contribuye a la desmielinización [503]. Cabe destacar que también se ha demostrado que las células B secretan moléculas neurotóxicas [504], que en combinación con los factores mencionados anteriormente inducen daño a la mielina y los oligodendrocitos, lo que promueve la neurodegeneración [505] (**Figura 2.6**).

**d. Limitación de la respuesta inmune:** Tras la aparición de los síntomas, los pacientes suelen mostrar una mejoría total o parcialmente como resultado de múltiples procesos fisiológicos antiinflamatorios que incluyen, entre otros factores, la apoptosis de las células inflamatorias [506]. Además, se cree que las citoquinas antiinflamatorias producidas en el SNC, como la IL-27 y el IFN- $\gamma$ , actúan sobre los linfocitos y las células presentadoras de antígeno para suprimir la inflamación [507], mientras que la microglía elimina los desechos y las células muertas. Además, varios estudios apuntan a las Treg como agentes importantes involucrados en la remisión a través de la producción de citoquinas inmunosupresoras y la expresión de moléculas antiinflamatorias adicionales como CD39 [378]. De hecho, las células Treg que expresan IL-10 y FoxP3 aumentan en la etapa de remisión de la EM [508], [509] (**Figura 2.6**). Así, estas células son capaces de suprimir la respuesta inmune ya sea limitando la presentación del antígeno a los linfocitos por parte de las células dendríticas, como regulando la proliferación de los linfocitos T ya activados. De esta forma, en los pacientes con EM se ha

## 2.2. INTRODUCCIÓN II



**Figura 2.6: Daño al SNC causado por células inmunes activadas.** (1) Los Th patogénicos secretan citoquinas proinflamatorias desencadenando la activación de otras células proinflamatorias como astrocitos, microglía, monocitos macrófagos, células B y células T citotóxicas. (2) Se produce daño axonal debido a la acción de las células inmunes mencionadas anteriormente, las cuales producen moléculas neurotóxicas. Múltiples mecanismos impulsan la mielina y el daño axonal, principalmente la producción de moléculas neurotóxicas solubles. (3) La inflamación local del SNC es limitada mediante células FOXP3+ Tr1 Tregs a través de la secreción de citoquinas inmunorreguladoras como IL-10 y TGF- $\beta$  y mecanismos adicionales [482].

descrito una disminución del número y del efecto supresor de las células Treg en sangre periférica en comparación con individuos sanos [88]. En este contexto, se ha propuesto que la enfermedad se define por etapas remitentes intercaladas con otras recurrentes. En las recaídas se da la expansión de las células T efectoras específicas del antígeno del SNC. Esta etapa es seguida por una fase de remisión en la que la expansión de las Tregs dirigidas contra el mismo antígeno controla la respuesta inicial patogénica. El ciclo se reinicia cuando se activan células T efectoras con diferente especificidad antigénica [510].

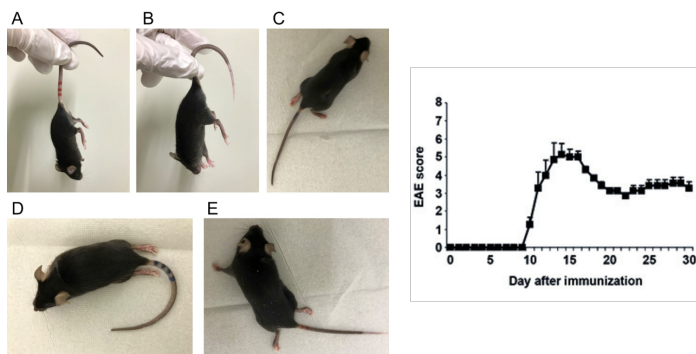
### 2.2.2.2. Modelo animal de la esclerosis múltiple: encefalomiелitis autoinmune experimental (*Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE*)

El estudio de los modelos animales de enfermedades neuroinflamatorias autoinmunes ha sido de gran utilidad para estudiar los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de esta enfermedad. Actualmente se establecen tres tipos diferentes de modelos animales para la exploración de los patrones patológicos de la EM: modelos virales como el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (*Theiler's murine encephalomyelitis virus, TMEV*), modelos inducidos por agentes tóxicos como la cuprizona y, finalmente, diferentes variantes de encefalomiелitis autoinmune experimental (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE*) [511]. Aunque todos reproducen las características de la EM, difieren enormemente en los procesos patológicos subyacentes, como la participación del sistema inmunitario adaptativo. Dentro de estas alternativas, la EAE es el modelo animal más común, ya que es especialmente útil para investigar las vías neuroinflamatorias implicadas en la EM.

La EAE es un proceso complejo en la que la interacción entre gran variedad de mecanismos inmunopatológicos y neuropatológicos conduce a una aproximación de las características patológicas claves en la EM: inflamación, desmielinización, pérdida axonal y gliosis. Además, los mecanismos que se desencadenan para resolver la inflamación y restaurar la mielinización axonal también ocurren en la EAE, por lo que también es útil como modelo para estos procesos. Asimismo, la EAE sirve como modelo de enfermedades autoinmunes de órganos concretos. La EAE se puede inducir en muchos animales diferentes (ratones, ratas, cerdos, cobayas, pollos o primates). Sin embargo, los ratones, y concretamente la cepa C57BL/6, se han convertido en la especie más utilizada, lo que se debe, al menos en parte, a la expansión de modelos transgénicos o *knock-out* de ratones [512] (**Figura 2.7**). La EAE no solo sirve como modelo de investigación básica para conocer los mecanismos patogénicos responsables de la EM, también es un modelo usado en investigación traslacional. Actualmente, muchos de los fármacos que se usan en humanos como tratamiento para esta enfermedad se han desarrolla-

## 2.2. INTRODUCCIÓN II

---



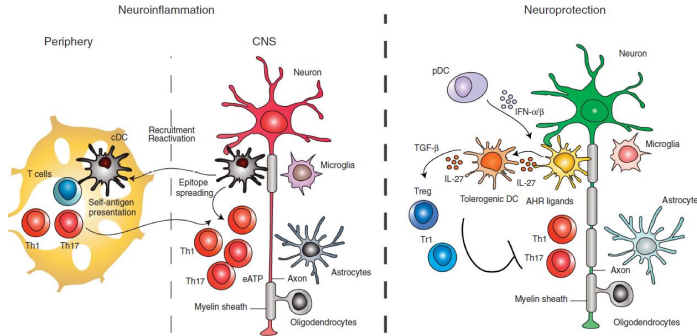
**Figura 2.7: Resultados representativos de EAE en ratones.** Imagen representativa de un ratón C57BL/6 inmunizado con síntomas de EAE (A-E) [516] y curso representativo de la enfermedad después de la inmunización durante 30 días [517].

do, probado o validado en base a la EAE [513], [514]. Así la EAE es un modelo versátil que permite el desarrollo y la validación de multitud de aproximaciones clínicas de una amplia gama de intervenciones terapéuticas [515].

### 2.2.2.3. Función de las células dendríticas en los procesos patológicos de autoinmunidad del sistema nervioso central

Las DC son células presentadoras de antígeno profesionales que controlan la activación y polarización de las células T en linajes específicos [518]. En el contexto de una infección, la inducción de respuestas inmunes específicas frente a patógenos proporciona inmunidad protectora para combatir la infección. Sin embargo, en el contexto de las enfermedades autoinmunes, las DC regulan el equilibrio entre los mecanismos inmunes patogénicos y reguladores, controlando el inicio y la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, las DC tienen un papel central en el control de la respuesta inmune adaptativa a patógenos y tejidos propios, siendo así potenciales candidatas para abordar la modulación terapéutica de la respuesta inmune.

En la mayoría de los pacientes, como se ha indicado anteriormente, la EM



**Figura 2.8: Función de las DC en la autoinmunidad del SNC.** En este contexto las DC tienen funciones proinflamatorias y antiinflamatorias: potencian la neuroinflamación al promover la activación de las células T efectoras, su reclutamiento y reactivación en el SNC, y promueven la diferenciación de Tregs a través de la producción de  $TGF\beta_1$ , ácido retinoico, kinurenina e IL-27 [433].

inicialmente presenta un curso clínico recurrente-remitente que es seguido por una fase progresiva (EM progresiva secundaria) caracterizada por la acumulación continua e irreversible de discapacidad [519]. En la progresión entre estas etapas las DC tienen un papel fundamental. Se ha encontrado una gran cantidad de DC en el líquido cefalorraquídeo y la materia blanca de los pacientes con EM, y las anomalías de las DC se han asociado con diferentes etapas de la enfermedad [520], [521]. En el contexto de la EM y su modelo de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), las DC tienen funciones importantes relacionadas con la generación del repertorio de células T y la activación, polarización y mantenimiento de las células T específicas en la periferia y el propio SNC (**Figura 2.8**). Cabe señalar que la EAE se puede producir en ratones carentes de DC, así aunque estas células tengan un rol relevante otras CPA pueden promover la diferenciación de la células T patogénicas [522].

En la periferia del SNC, un entorno tolerogénico se logra gracias a la inducción de  $CD4^+$   $FoxP3^+$  Tregs. De hecho, las DC promueven la diferenciación de esta población de Treg a través de la producción de  $TGF\beta_1$ , ácido retinoico y kinurenina [523]-[525]. Pero las DC también pueden promover la diferenciación de células T

## 2.2. INTRODUCCIÓN II

---

reguladoras de tipo 1 FoxP3- IL10+ (células Tr1) a través de varios mecanismos, incluida la producción de IL-27 [526], [527]. Las DC contribuyen no solo a la diferenciación sino también al mantenimiento de Tregs en la periferia a través de interacciones dependientes de CD80 y CD86 [528]. Pero hay que tener en cuenta que aún no está claro si estas poblaciones constituyen linajes de DC tolerogénicas específicas o son estados de transición de activación o maduración de las DC [529]. Se cree que la propagación del epítipo en el SNC puede recaer en una población de DC (F4/80-CD11c+CD45hi), la cual fue descubierta en un modelo de ratón de EM [481]. Sin embargo, hay otras DC que infiltran el SNC que no promueven la inflamación limitando la diferenciación de las células T efectoras Th1 y Th17 de forma dependiente de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (*Indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO) [530]. En conjunto, numerosos estudios muestran como tanto en la periferia como en el SNC, las DC controlan el equilibrio entre las células T efectoras y reguladoras y, en consecuencia, el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

### 2.2.2.4. Microbiota intestinal: AHR y probióticos en la EM

Los mamíferos han coevolucionado con una gran cantidad de microorganismos comensales en el sistema digestivo. Se estima que, en humanos, la superficie interna del tracto gastrointestinal alberga más de 100 billones de células microbianas pertenecientes a más de 1000 especies bacterianas [531]. Por lo tanto, no llama la atención que el microbioma desempeñe un rol de importancia en la fisiología, incluida la regulación del desarrollo y la función del sistema inmune [532]. De hecho, las perturbaciones en la microbiota (denominadas disbiosis) se han relacionado con múltiples afecciones inflamatorias [533].

El concepto “eje intestino-SNC” (*Gut-SNC axis*) surge hace más de 200 años cuando microbiólogos, neurólogos y científicos encontraron conexión entre el sistema gastrointestinal y el SNC [534]. Principalmente se considera que las bacterias intestinales o microbioma son las responsables de la interconexión intestino-cerebro (sistema nervioso). Así la salud intestinal puede impulsar la homeostasis del sistema nervioso abarcando desde procesos patológicos como la EM o incluso las emociones [535], [536] (**Figura 2.9**).



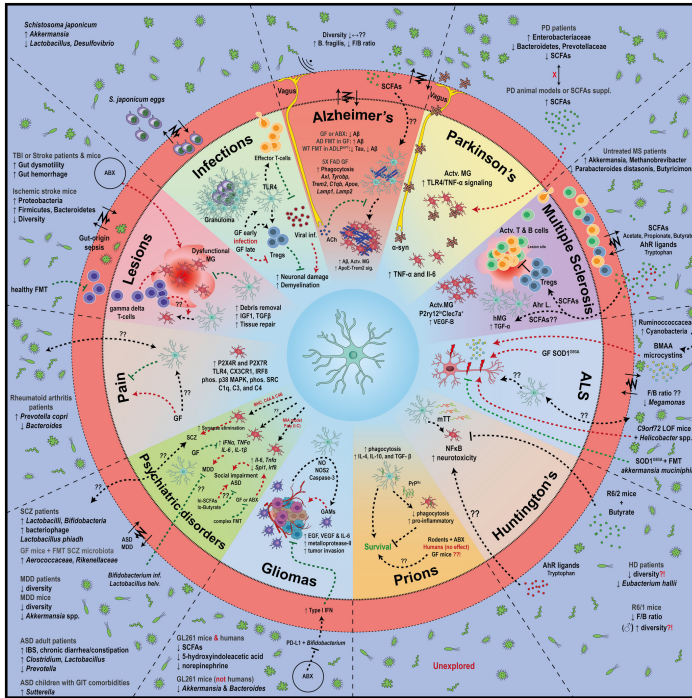
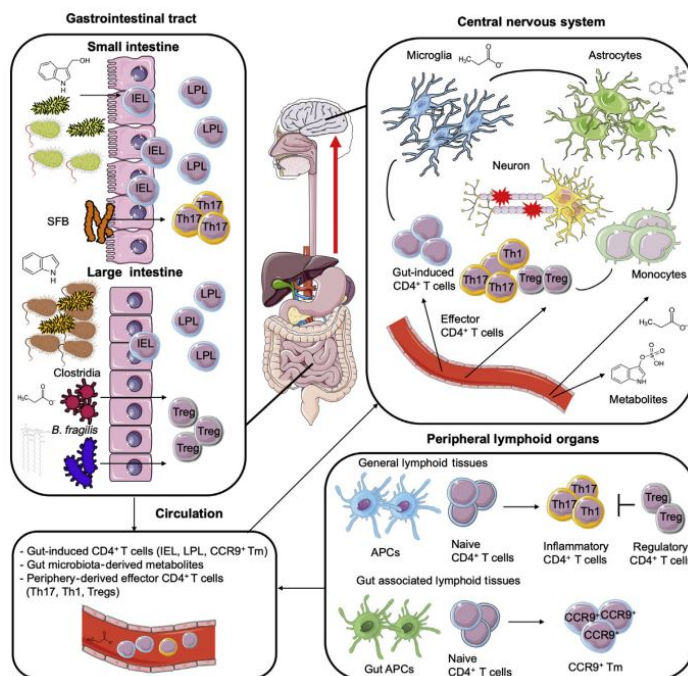


Figura 2.9: El eje microbiota-SNC en el contexto de varios trastornos neurodegenerativos donde existen conexiones conocidas entre las bacterias intestinales y la patología de la enfermedad [537].

La patogenia de la EM se ha relacionado con factores genéticos y ambientales, demostrándose que la flora intestinal modula los procesos inmunitarios relevantes para la patogenia de la EM [538]. De hecho, estudios recientes sugieren que el curso de la EM está influenciado por los efectos del microbioma en el eje intestino-SNC. Las alteraciones en el entorno intestinal pueden exacerbar o inhibir el desarrollo de EAE [539], [540]. Los primeros estudios mostraron que eliminar la microbiota intestinal con antibióticos orales suprime la EAE [541], [542] y los ratones libres de gérmenes (*Germ Free*) carentes de la microbiota intestinal no presentan inflamación autoinmune del SNC [539]. Otros estudios han identificado las bacterias filamentosas segmentadas (*segmented filamentous bacteria*,

## 2.2. INTRODUCCIÓN II



**Figura 2.10:** En el intestino se produce la presentación y se promueve la diferenciación de las células T CD4+ como pueden ser Th17, Treg, linfocitos intraepiteliales (IEL) y linfocitos de lámina propia (LPL). Estas células migran al SNC y regulan la inflamación. Los metabolitos producidos por la microbiota llegan al SNC directamente o después de un procesamiento adicional en otros órganos [538].

SFB) como inductores principales de la diferenciación de células Th17 [543]. Sin embargo, se ha demostrado que la flora comensal promueve la diferenciación de las células Treg a través de la producción de múltiples metabolitos. Por ejemplo, el polisacárido A (*Polysaccharide A*, PSA) producido por el microorganismo *Bacteroides fragilis* que coloniza el colon humano promueve la expansión de las células T CD4+ productoras de IL-10 antiinflamatorias [544]-[548] (**Figura 2.10**).

La inmunorregulación impulsada por el PSA también involucra a la ectoenzima CD39, que desempeña un papel central en el control de la inflamación del SNC

al modular la señalización purinérgica en las CPA y las células T (anteriormente mencionado) [240], [549], [550]. Los ácidos grasos de cadena corta, uno de los principales productos de la fermentación bacteriana de la fibra dietética, también inducen células Tregs en el colon [551] y en el intestino delgado, los cuales se ha comprobado que suprimen la inflamación del SNC [540]. Del mismo modo, tanto en humanos como en ratones, se ha demostrado que las cepas de *Clostridium* en el colon inducen Tregs a través de un mecanismo relacionado con la producción de ácidos grasos cortos [552], [553]. Estos hallazgos sugieren un papel importante del microbioma en el control de las células T proinflamatorias y antiinflamatorias.

AHR puede actuar como mediador entre el microbioma intestinal y las células residentes del SNC. Este factor de transcripción integra señales ambientales, dietéticas, microbianas y metabólicas de forma específica de ligando y célula. La triptofanasa (TnAse) de la microbiota cataliza la conversión del triptófano de la dieta en indol, el cual actúa como precursor para la síntesis de indoxil-3-sulfato (I3S), indol-3-aldehído (3-IAld) e indol-3-propionato (I3PA). El metabolismo microbiano del Trp de la dieta también produce ligandos AHR adicionales como el ácido indol-3-acético (IAA) y la triptamina (TA) [254], [554], [555]. Estos productos del metabolismo del triptófano de la actividad bacteriana afectan a la actividad de las células inmunes a través de la activación de receptores xenobióticos como PXR (*Pregnane X Receptor*, PXR) y AHR. Se ha comprobado que *Lactobacillus reuteri*, una bacteria triptofanasa estimula la actividad de AHR y suprime las actividades proinflamatorias [555]-[557]. Además, la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa-1 (IDO-1) encargada de la degradación del triptófano está relacionada con la supresión de las respuestas de las células T patogénicas e incremento de las respuestas de las células T reguladoras tolerogénicas [558].

Numerosos estudios han evidenciado que la activación de AHR mediada por metabolitos microbianos intestinales regula la función de la microglía y los astrocitos en el contexto de la inflamación del SNC [559], [560]. En particular, AHR limita las respuestas proinflamatorias impulsadas por NF- $\kappa$ B en los astrocitos a través de un mecanismo dependiente de SOCS2, y la eliminación de Ahr en los astrocitos agrava la EAE [561]. La administración oral de metabolitos de triptófano que activan TnAse o AHR recapituló algunos de los efectos antiinflamatorios del

## 2.2. INTRODUCCIÓN II

---

microbioma intestinal en los astrocitos y la microglia [562]. Además, se descubrió que la modulación de la señalización de AHR por estos metabolitos controla la producción microglial de TGF- $\alpha$  y VEGF- $\beta$  suprimiendo la expresión génica proinflamatoria y neurotóxica (TNFA, IL6, IL12A, NOS2) y aumentó la expresión antiinflamatoria de IL10. La activación de AHR en la microglía humana también promovió TGF- $\alpha$  y suprimió la expresión de VEGF- $\beta$  aunque en astrocitos humanos TGF- $\alpha$  se inhibió y VEGF- $\beta$  aumentó. En pacientes con EM se encontró que los agonistas de AHR en suero se modulan dinámicamente durante el curso de la enfermedad [561], [563], [564]. Estos hallazgos sugieren que AHR funciona como una molécula de punto de control que limita las actividades proinflamatorias de las células residentes del SNC en respuesta a señales microbianas que actúan como inmunomoduladores del eje intestino-SNC.

Según la Organización Mundial de la Salud, los probióticos son los microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped [565]. El tratamiento con probióticos orales mejora o restaura la microbiota intestinal generando resultados prometedores en el tratamiento de trastornos intestinales como la colitis ulcerosa o la obesidad [566]-[568], enfermedades autoinmunes [569] e incluso cáncer [570].

Con el avance de la biotecnología y la biología sintética se han podido desarrollar microorganismos diseñados tanto para detectar las condiciones patológicas como tratamientos terapéuticos. La cepa bacteriana más comúnmente usada para este propósito y más estudiada, es *E. coli* Nissle (EcN). EcN es una bacteria no patógena aislada de las heces de un soldado a quien parecía no afectarle la infección por *Shigella*. Esta cepa, aparte de proteger frente a la infección por diversos patógenos [571]-[573], demuestra tener potentes propiedades inmunomoduladoras limitando la secreción de citoquinas proinflamatorias y aumentando la de citoquinas tolerogénicas [574]-[576]. Por todo ello, esta cepa bacteriana es legalmente administrada sin modificar genéticamente en Europa y Canadá para tratar diversas afecciones gastrointestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal (*Inflammatory Bowel Disease*, IBD) [577]. Sin embargo, se ha modificado EcN en diversos estudios con diferentes objetivos. Un ejemplo es la cepa SYN1891, la cual favorece las respuestas de las células T en el control tumoral

al mejorar la activación de las células del sistema inmune innato como las DC, las cuáles aumentan la producción de interferones [578].

Aunque se han identificado microorganismos, tipos de células y metabolitos específicos que participan en este eje intestino-SNC, se sabe poco sobre los mecanismos subyacentes. Unos estudios más profundos de estos mecanismos por los cuales la microbiota intestinal controla la inflamación del SNC, en combinación con el desarrollo de microorganismos diseñados optimizados para sus actividades antiinflamatorias y neuroprotectoras, guiarán el desarrollo de enfoques basados en probióticos para la EM y otros trastornos neurológicos.

## 2.2. INTRODUCCIÓN II

---

## **2.3. Objetivos II**

La EM es una enfermedad que carece de un marcador biológico específico. Su diagnóstico requiere la monitorización de la diseminación temporal y espacial de las lesiones desmielinizantes en el SNC gracias a las técnicas de resonancia magnética, junto con la exclusión de otras patologías que pudieran justificar las manifestaciones clínicas del enfermo. En los últimos años se han experimentado cambios importantes en el tratamiento de la EM, gracias a los estudios sobre la patogenia de la enfermedad. El conocimiento y la comprensión de los mecanismos inmunológicos implicados en la EM, ha suscitado la importancia de las terapias con base inmunológica. Un eje primordial en las investigaciones inmunológicas sobre la EM lo constituyen las células dendríticas (DC), ya que pueden ser uno de las primeras células en intervenir definiendo el entorno patogénico de la enfermedad. Así el objetivo general de este capítulo ha sido estudiar la implicación de Ahr en el modelo murino de EM, la EAE. Para ello, hemos abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Definir el rol de Ahr en las células dendríticas (DC) durante la EAE.
2. Estudiar la relación de Ahr en las DC con otros factores inmunoreguladores y relevantes en el desarrollo de la EAE como es la ectoenzima CD39 y el ácido graso DHA.
3. Analizar el efecto de los ligandos de Ahr producidos por la microbiota intestinal en las DC.
4. Determinar el efecto de los probióticos productores de IAA en el modelo EAE y su potencial como terapia inmunoreguladora.

### **2.3. OBJETIVOS II**

---



## 2.4. Resultados II

### 2.4.1. Ahr en células dendríticas limita el desarrollo de la EAE.

Ahr juega un papel importante en el desarrollo del sistema inmune en ratones [12]. Concretamente, diversos estudios avalan la relevancia del receptor en las DC tanto en su maduración como en sus funciones [254]. Para investigar el rol de Ahr en el control de la inflamación del SNC durante la EAE, analizamos si se producía cambios en sus niveles de expresión génica durante el proceso patogénico de este modelo. *Ahr* aumenta su expresión en las DC durante el pico de la EAE (**Figura 2.11A**). De hecho, eliminar Ahr específicamente en DC exacerba la patogenia de la EAE (**Figura 2.11B**) y aumentó el número de células T proinflamatorias IL17+CD4+ y Ifn $\gamma$ +CD4+ mientras que provocó una disminución del porcentaje de las células T reguladoras Foxp3+CD4+ y IL10+CD4+ (**Figura 2.11C-F**).

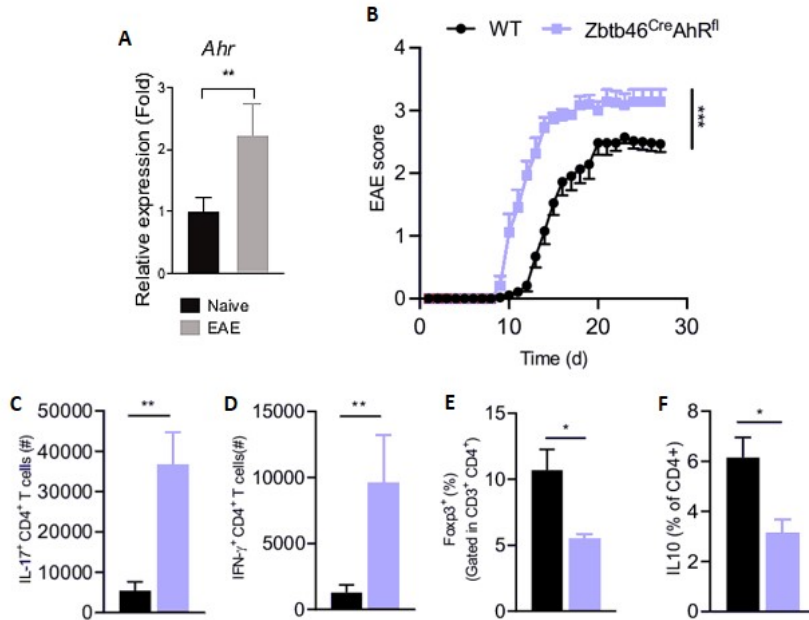
Estos datos sugieren la relevancia funcional de Ahr en las DC en este modelo, pues su activación podría limitar la inflamación del SNC durante la EAE al promover la expansión de las poblaciones de células CD4+ que expresan marcadores tolerogénicos.

### 2.4.2. Ahr impulsa la expresión de CD39 en células dendríticas

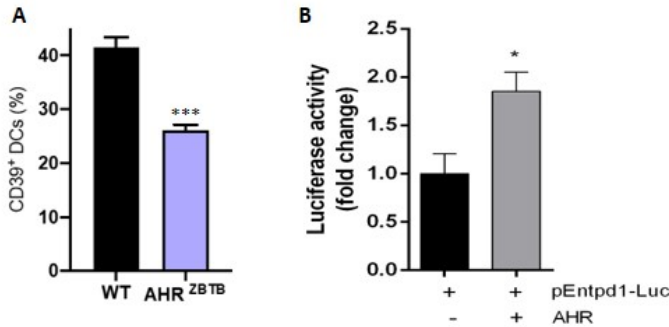
CD39 es una ectonucleotidasa que cataliza la degradación del ATP y ADP extracelular [579]. El ATP extracelular desencadena la activación del inflamasoma NLRP3 [580], un proceso que se ha demostrado que controla la diferenciación de las células TH1 y TH17 durante la EAE [581]. Como apoyo a la hipótesis de que AHR está íntimamente relacionado con el control de la expresión de CD39 en las DC, el porcentaje de células DC CD39+ disminuyó significativamente en ausencia de AHR durante la EAE (**Figura 2.12A**). Además, Ahr produce la transactivación del promotor de CD39, pEntpd1, en ensayos *in vitro* (**Figura 2.12B**).

En conjunto, estos datos sugieren que AHR promueve la expresión

## 2.4. RESULTADOS II



**Figura 2.11: Ahr en las células dendríticas limita el desarrollo de la EAE.** (A) La expresión génica de *Ahr* se determinó en las DC obtenidas de ratones wildtype control (*Naive*) e inducidos para la EAE. Los niveles de expresión de *Gapdh* se usaron para normalizar la expresión del gen de interés ( $\Delta$ Ct) y  $2^{-\Delta\Delta$ Ct para calcular los cambios en los niveles de ARNm con respecto a los ratones control. (B) Puntuación de la monitorización diaria asignada en función de los signos clínicos de la enfermedad en ratones *wildtype* (WT) o carentes de Ahr en DC (Zbtb46<sup>Cre</sup>AHR<sup>fl</sup>). (C-D) Porcentaje de células en SNC de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> que expresan IL17 (C) IFN $\gamma$  (D), Foxp3 (E) e IL10 (F) en ratones *wildtype* (WT) o carentes de Ahr en DC (Zbtb46<sup>Cre</sup>AHR<sup>fl</sup>) con inducción de EAE. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).



**Figura 2.12: Ahr dirige la expresión de CD39 en DC.** (A) Porcentaje de DC totales que expresen CD39 en ratones *wildtype* (WT) o carentes de Ahr en DC (Zbtb46<sup>cre</sup>AHR<sup>fl</sup>). (B) Actividad relativa de la luciferasa en células HEK293 transfectadas con un reportero de luciferasa precedida por la región promotora de *Entpd1*, solo o junto con una construcción que codifica Ahr durante 24 h. \* ( $p < 0,05$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

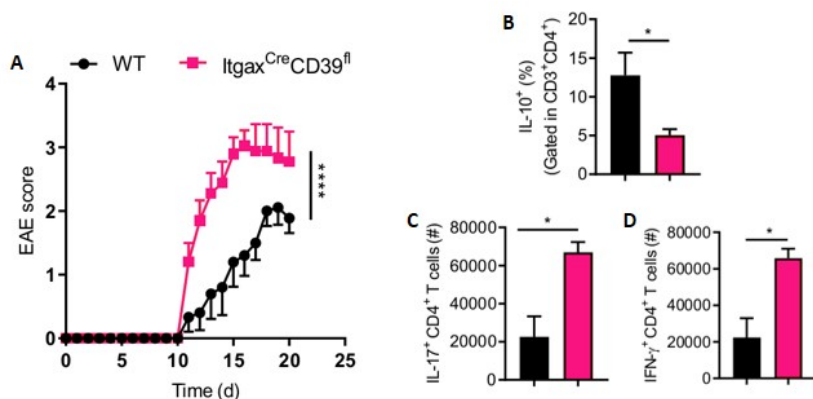
de CD39 en células DC, lo que podría ser un hecho relevante en el control de la inflamación del SNC en el modelo de la EAE.

### 2.4.3. ENTPD1 en células dendríticas limita el desarrollo de EAE

La expresión de CD39 contribuye a la función supresora de las Treg en el contexto de la autoinmunidad y el cáncer [397]. Por ello, analizamos el efecto de la supresión génica de CD39 sobre la EAE. La inducción de EAE condujo a un agravamiento de la patología en ratones CD39-KO (**Figura 2.13A**). El empeoramiento de este genotipo se correlacionó con una mayor frecuencia de células T CD4+IL17+ y CD4+IFN $\gamma$ +, y una disminución de CD4+IL10+ en el SNC (**Figura 2.13C-D**).

Las diferencias encontradas en el modelo *in vivo* nos llevaron a analizar los cambios de expresión en las DC que pudieran ser responsables de estos resultados. El análisis de expresión génica de las DC aisladas de ratones WT y

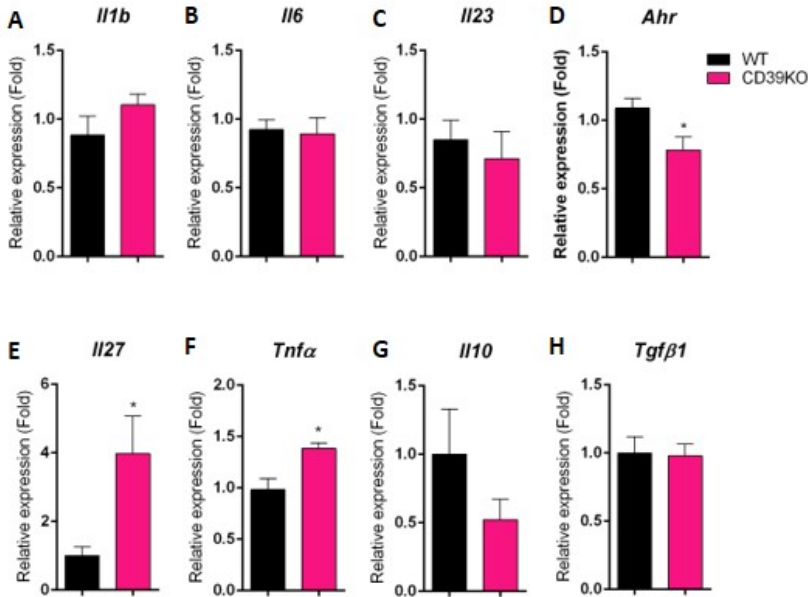
## 2.4. RESULTADOS II



**Figura 2.13: CD39 en las células dendríticas (DC) controla las poblaciones de células T y el desarrollo de EAE.** (A) Puntuación de la monitorización diaria asignada en función de los signos clínicos de la enfermedad en ratones *wildtype* (WT) o carentes de CD39 en DC (*Itgax<sup>Cre</sup>CD39<sup>fl</sup>*). (B-D) Porcentaje de células de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> positivas para IL10 (B), IL17 (C) e IFN $\gamma$  (D) en SNC de ratones *wildtype* (WT) o carentes de CD39 en DC (*Itgax<sup>Cre</sup>CD39<sup>fl</sup>*) con inducción de EAE. \* ( $p < 0,05$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

CD39-KO reveló una disminución significativa de Ahr al eliminar CD39. Este resultado es paralelo al encontrado al silenciar Ahr en las DC, lo que podría ser consecuencia de la existencia de un bucle de regulación recíproca entre ambas proteínas (**Figura 2.14D**). De todos los genes analizados correspondientes a diferentes citoquinas, solo cambiaron su expresión de forma significativa Il27 y Tnf $\alpha$  (**Figura 2.14E-F**), los cuales aumentaron en ausencia de CD39. Sin embargo, la expresión de Il1b, Il6, Il23 y Tfg $\beta$  permanecieron casi invariables entre ambos genotipos. Aunque Il10 no mostró diferencias significativas sí mostró una leve tendencia a la reducción de su expresión génica en ausencia de CD39 (**Figura 2.14A-C,G-H**). Quizás los discretos cambios encontrados se deben a una escasa maduración y activación de las DC.

Cocultivos *in vitro* de DC CD39-KO junto con células T 2D2+CD4<sup>+</sup> sin activar (*Naive*) en presencia de LPS y MOG (35–55), expresaron de forma significativa mayor niveles de citoquinas proinflamatorias Il17, Ifn $\gamma$  y Csf2 (**Figura 2.15A-**

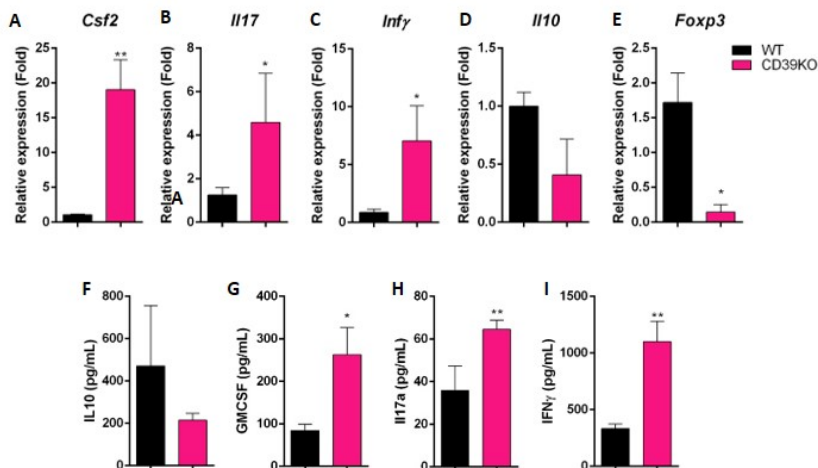


**Figura 2.14: Cambios de expresión en las DC al silenciar CD39.** Se cultivaron *in vitro* DC *wildtype* (WT) o carentes de CD39 (CD39KO) con LPS y MOG (35-55) durante 24 h. Se analizó la expresión génica mediante RT-PCR de (A) *Il1b*, (B) *Il6*, (C) *Il23*, (D) *Ahr*, (E) *Il27*, (F) *Tnfα*, (G) *Il10* y (H) *Tgfβ1*. Los niveles de expresión de *Gapdh* se usaron para normalizar la expresión del gen de interés ( $\Delta Ct$ ) y  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para calcular los cambios en los niveles de ARNm con respecto a los ratones *wildtype*. \* ( $p < 0,05$ ).

C) que los cocultivos con DC WT. Por el contrario, la expresión de las citoquinas reguladoras Foxp3 y Il10 disminuyó (aunque Il10 de forma no significativa) (**Figura 2.15D-E**) en ausencia de CD39. Además, los cocultivos con las DC CD39-KO mostraron una mayor liberación al medio de las citoquinas GMCSF, IL17 e IFN $\gamma$  (**Figura 2.15G-I**), a expensas de una reducción no significativa de la secreción de IL10 (**Figura 2.15F**).

Por lo tanto, la posibilidad de que AHR regule la expresión de CD39 en células dendríticas (DC) tendría como resultado limitar la respuesta de las células T proinflamatorias y el desarrollo de EAE.

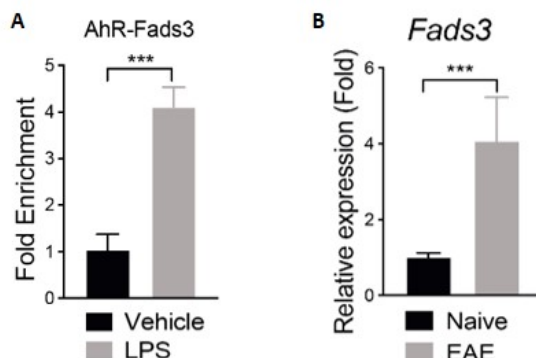
## 2.4. RESULTADOS II



**Figura 2.15: CD39 en DC limita la activación de células T.** Se activaron DC *wildtype* (WT) o carentes de CD39 (CD39KO) durante 24 h con LPS y MOG (35–55) y posteriormente se cocultivaron con células T CD42D2+ durante 24 h. (A-E) Se analizó la expresión génica mediante RT-PCR de *Csf2*, *Il17*, *Infy*, *Il10* y *Foxp3* y (F-I) la secreción de citoquinas IL10, GMCSF, IL17 e IFN $\gamma$ , respectivamente. Los niveles de expresión de *Gapdh* se usaron para normalizar la expresión del gen de interés ( $\Delta$ Ct) y  $2-\Delta\Delta$ Ct para calcular los cambios en los niveles de ARNm con respecto a los ratones *wildtype*. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ).

### 2.4.4. El metabolismo de los ácidos grasos está impulsado por Ahr

Fads3 es una desaturasa de ácidos grasos responsable del metabolismo del DHA en el cerebro [425]. Este PUFA tiene relevancia en el sistema inmune y afecta a la función de CPA de las DC [411]. Encontramos que Ahr se unió a sus regiones promotoras al activar las DC con LPS, por lo que podría estar controlando su expresión génica (Figura 2.16A). Para determinar si este gen era relevante en nuestro modelo de EAE, analizamos si se producía cambios en sus niveles de expresión génica durante el pico de la EAE. *Fads3* aumentó su expresión en las DC durante la EAE (Figura 2.16B).



**Figura 2.16: La expresión génica de *Fads3* es regulada por Ahr en DC y participa en la EAE.** (A) Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para analizar la unión de Ahr a los en el promotor de *Fads3* al activar las DC con LPS durante 24 h. (B) La expresión génica de *Fads3* se determinó en DC obtenidas de ratones *wildtype* control (*Naive*) e inducidos para la EAE. Los niveles de expresión de *Gapdh* se usaron para normalizar la expresión del gen de interés ( $\Delta\text{Ct}$ ) y  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  para calcular los cambios en los niveles de ARNm con respecto a los ratones control. \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

Estos datos sugieren que Ahr podría regular la inflamación durante la EAE al controlar la expresión de *Fads3* en células DC, el cual podría tener especial importancia en estas respuestas.

#### 2.4.5. El tratamiento con DHA en células dendríticas limita las respuestas proinflamatorias

Se ha demostrado que el DHA tiene efectos protectores en muchos tipos de afecciones inflamatorias, como la artritis reumatoide, el asma, la enfermedad de Crohn y la psoriasis [582]. Para confirmar que el DHA no afectaba a la viabilidad de las DC *in vitro* probamos diferentes concentraciones de DHA, en concreto 5, 10 y 50  $\mu\text{M}$ . En ninguno de los tres casos la supervivencia celular de las DC se vio comprometida (**Figura 2.17A**). Para llevar a cabo los experimentos posteriores seleccionamos la concentración de 50  $\mu\text{M}$ , ya que es la concentración

## 2.4. RESULTADOS II

---

más reportada en numerosas publicaciones científicas relacionadas con nuestro trabajo. Confirmamos el efecto inmunosupresor del DHA mediante análisis de expresión génica de diferentes marcados asociados a un proceso proinflamatorio como son la *Il1b*, *Il6*, *Il12*, *Il23*, *Nos2*, *Tnfa* y *Tgfb1* (**Figura 2.17B-H**), debido a que todos ellos disminuían en presencia del DHA.

Además, quisimos corroborar que este efecto se producía directamente por la metabolización del DHA a través de *Fads3*. Por ello llevamos a cabo un experimento paralelo al mencionado anteriormente en las DC carentes de la expresión de *Fads3* y analizamos los cambios de expresión en algunos de los genes que ya habíamos determinado. Al carecer de *Fads3* tanto en el vehículo como tras el tratamiento de DHA los niveles de expresión de estos genes fueron superiores en células DC carentes de *Fads3* (**Figura 2.17I-K**). Incluso en el caso de *Tgfb1* el tratamiento del DHA incrementó su nivel de expresión por encima de su vehículo en *Fads3*<sup>-/-</sup> (**Figura 2.17K**).

Probamos si este efecto inmunoregulador en DC se traducía en efectos paracrinicos. Para llevar a cabo este objetivo cocultivamos in vitro DC junto con células T 2D2+CD4+ sin activar (*Naive*) en presencia de LPS y DHA. Encontramos una menor liberación de todas las citoquinas analizadas, IFN $\gamma$ , GMCSF, IL17 e IL10 (**Figura 2.18A-D**).

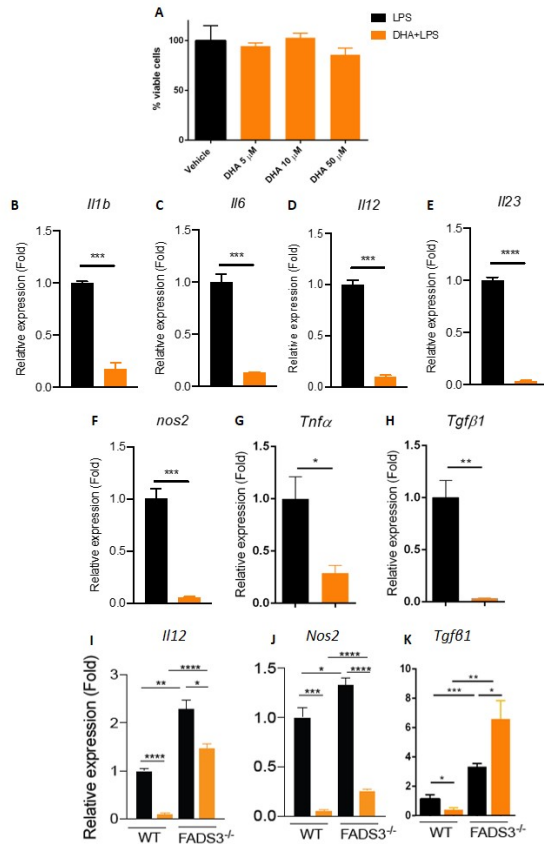
***Fads3* limita las respuestas proinflamatorias a través del metabolismo del DHA. Así el eje Ahr-*Fads3* en este modelo podría contribuir a controlar el desarrollo patogénico de la EAE.**

### 2.4.6. Efectos en células dendríticas de los ligandos endógenos de Ahr derivados del metabolismo de la microbiota

Se han descrito niveles reducidos de ligandos de AHR circulantes en pacientes con EM, lo cual se correlaciona con mayor duración y gravedad de la enfermedad, así como con la atrofia progresiva del SNC [561], [564], [583]. El Trp es un aminoácido esencial proporcionado por la dieta que es metabolizado por la microbiota en varios ligandos de AHR [584] como el IAA y la TA. También se



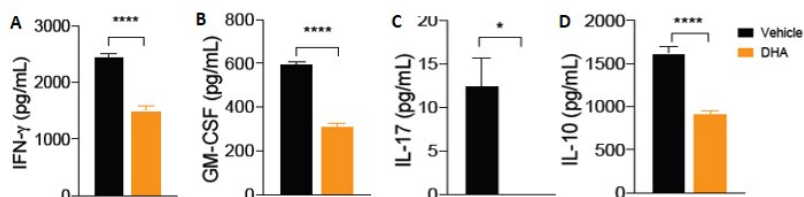
## 2.4. RESULTADOS II



**Figura 2.17: Cambios de expresión génica en DC al tratar con DHA.**

(A-H) Se cultivaron *in vitro* DC *wildtype* (WT) o (I-K) *Fads3*<sup>-/-</sup> con LPS y DHA durante 24 h. (A) Se determinó la viabilidad celular al tratar con 5, 10 ó 50  $\mu$ M de DHA mediante citometría FACS. (B-H) Expresión génica analizada mediante RT-PCR de (B) *Il1b*, (C) *Il6*, (D) *Il12*, (E) *Il23*, (F) *Nos2*, (G) *Tnf $\alpha$* , (H) *Tgf $\beta$ 1*, (I) *Il12*, (J) *Nos2* y (K) *Tgf $\beta$ 1*. Los niveles de expresión de *Gapdh* se usaron para normalizar la expresión del gen de interés ( $\Delta$ Ct) y 2- $\Delta\Delta$ Ct para calcular los cambios en los niveles de ARNm con respecto al tratamiento vehículo. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,001$ ).

## 2.4. RESULTADOS II

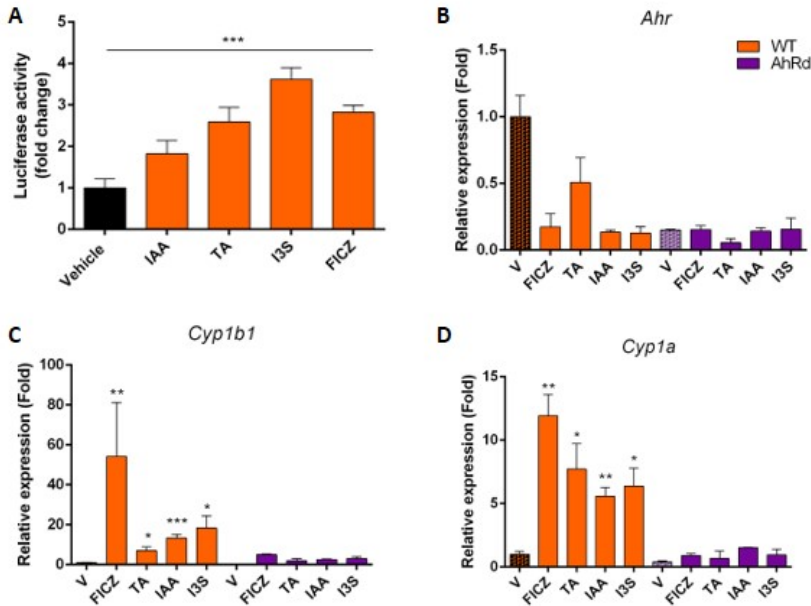


**Figura 2.18: Efectos paracrinos del DHA.** Se activaron DC *wildtype* (WT) durante 24 h con LPS junto con DHA (50  $\mu$ M) o su vehículo y, posteriormente se cocultivaron con células T CD42D2+ durante 24 h. Se analizó la secreción de citoquinas (A) IFN $\gamma$ , (B) GMCSF, (C) IL17 e (D) IL10. \* ( $p < 0,05$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,001$ ).

produce indol, el cual es esencial para la producción de I3S en el hígado [254].

Para investigar más a fondo los efectos de estos ligandos en la regulación transcripcional dependiente de AHR, realizamos un ensayo de reportero utilizando una construcción en la que el promotor de AHR controla la expresión de luciferasa. La exposición de las células HEK293 a IAA, TA y I3S transactivó este promotor sensible a AHR de forma significativa en todos los casos. También incluimos en este experimento al ligando de AHR, FICZ, derivado del Trp y usado extensamente en estudios del receptor, para confirmar la efectividad del sistema (**Figura 2.19A**). Sin embargo, al tratar las DC con estos ligandos no aumentó la expresión del receptor (**Figura 2.19B**), aunque sí lo hicieron sus dianas transcripcionales *Cyp1a1* y *Cyp1b1* (**Figura 2.19C-D**). Además, empleamos DC que portan una variante mutante de Ahr con baja afinidad por sus ligandos (AhRd) para confirmar que los cambios de expresión se debían a la unión de estos ligandos (**Figura 2.19C-D**).

**Por lo tanto, en las DC estos ligandos desencadenan la actividad transcripcional del receptor, aunque no induzcan su expresión de forma dependiente de su unión.**



**Figura 2.19: Ahr se activa transcripcionalmente en las DC de forma dependiente de la unión de ligandos endógenos producidos por la microbiota.** (A) Las células HEK293 se transfectaron con un plásmido reportero sensible a AHR (pGud-Luc) y se trataron con IAA, TA, I3S (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y FICZ (0,5  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h. (B-D) Se activaron DC WT o AHRd durante 24 h con LPS junto con IAA, TA, I3S y FICZ, a las mismas concentraciones indicadas anteriormente. Se analizó la expresión génica de (B) *Ahr*, (C) *Cyp1b1* y (D) *Cyp1a1* mediante RT-PCR. Los niveles de expresión de *Gapdh* se usaron para normalizar la expresión del gen de interés ( $\Delta\text{Ct}$ ) y  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  para calcular los cambios en los niveles de ARNm con respecto al tratamiento Vehículo. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

## 2.4. RESULTADOS II

---

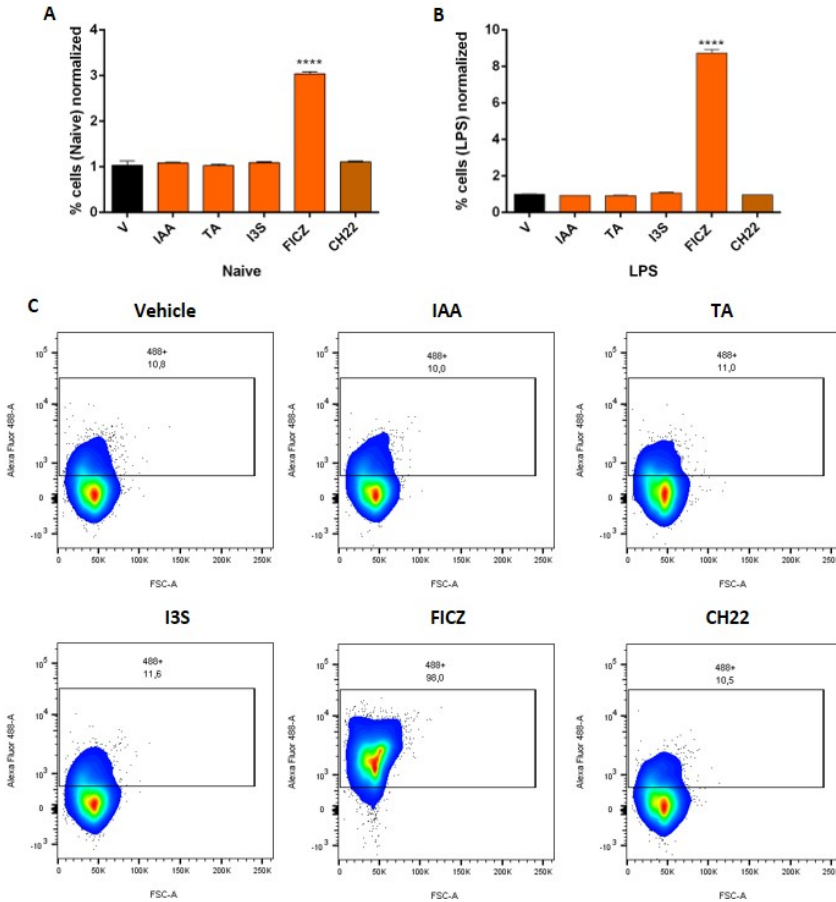
### 2.4.7. Regulación de la respuesta inmune de las células dendríticas mediada por los ligandos endógenos de Ahr

NF- $\kappa$ B es fundamental en la regulación del sistema inmune, ya que promueve la diferenciación de células Th1 y Th17 a través de sus efectos sobre otras células T y las células presentadoras de antígenos [585], [586]. Con el objetivo de determinar si estos ligandos activaban la señalización de NF- $\kappa$ B en DC se emplearon ratones transgénicos NF- $\kappa$ B-GFP-luciferasa, los cuales expresan una proteína fluorescente impulsada por NF- $\kappa$ B. Se determinó el número de células fluorescentes tras el tratamiento con los ligandos IAA, TA, I3S, FICZ y el inhibidor CH223191 de AHR en DC vírgenes o activadas con LPS. Ninguno de los ligandos endógenos activó esta señalización, siendo el FICZ el único tratamiento que aumentaba la activación de NF- $\kappa$ B tanto en DC *Naive* como DC tratadas con LPS (**Figura 2.20A-C**).

Posteriormente, decidimos seleccionar uno de estos ligandos para probar su efecto *in vitro* en las DC. El ligando elegido fue el IAA, el cual modificó el programa transcripcional de las citoquinas proinflamatorias en las DC. Todos los genes estudiados en las DC WT (*Il1b*, *Il6*, *Il12*, *Il23*, *Tgf $\beta$ 1* y *Tnf $\alpha$* ) redujeron sus niveles de expresión en presencia de IAA. Confirmamos que estas respuestas eran dependientes de Ahr, pues en DC con baja afinidad por ligandos (AhRd) esta respuesta no se produjo, excepto en el caso de *Tnf $\alpha$*  que sí disminuyó su expresión aunque de forma menos significativa (**Figura 2.21A-F**).

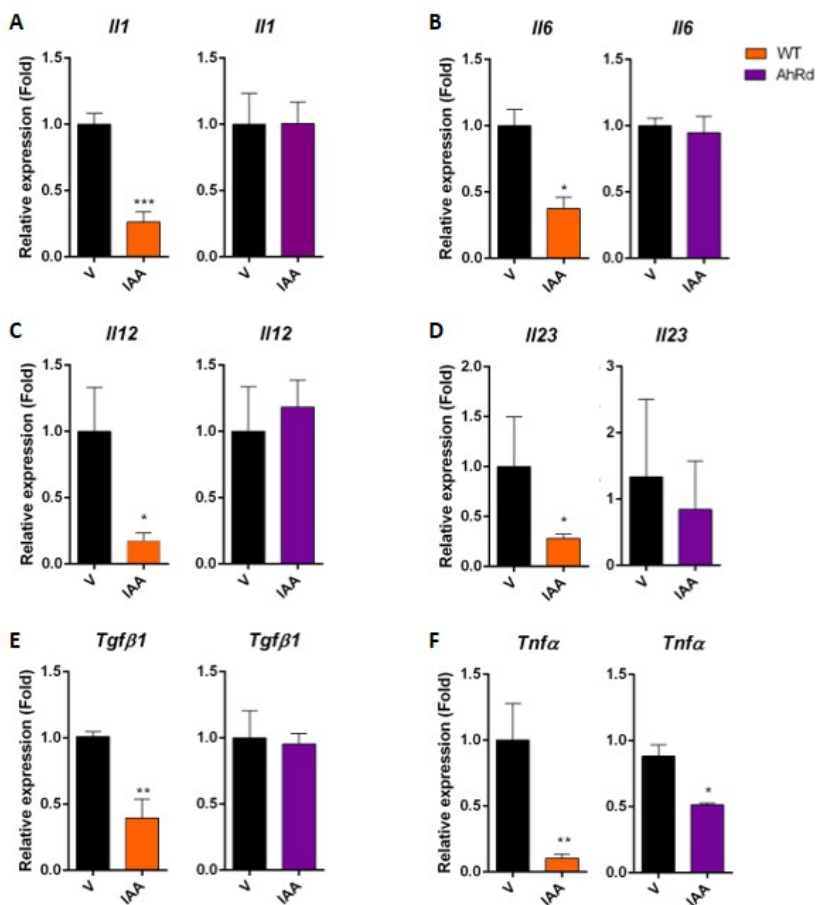
Las DC controlan la polarización de las células T. Por este motivo analizamos si el cambio en la función CPA tras el tratamiento con IAA, se habría traducido en algún efecto al cocultivarlas con células T 2D2+ CD4+. Analizamos la expresión génica del cocultivo y encontramos que los niveles de expresión de las citoquinas proinflamatorias *Csf2* y *Ifn $\gamma$*  disminuyeron significativamente e igualmente *Tnf $\alpha$*  mostró una disminución sin llegar a ser estadísticamente significativo (**Figura 2.22A-C**). Por el contrario, las citoquinas reguladoras aumentaron su expresión, *Foxp3* e *Il10*, aunque no lo hicieron de manera estadísticamente significativa (**Figura 2.22D-E**). A pesar de que estos resultados no mostraron una

## 2.4. RESULTADOS II



**Figura 2.20:** Los ligandos endógenos de Ahr no activan NF- $\kappa$  en DC. DC NF- $\kappa$ B-GFP-luciferasa (A) sin activar *Naive* o (B) activadas con LPS fueron estimuladas durante 1 h con IAA, TA, I3S (100  $\mu$ g/mL) y FICZ (0,5  $\mu$ M). Se muestra el porcentaje relativo de células fluorescentes determinado mediante citometría de flujo. (C) Paneles representativos del análisis de citometría de los diferentes tratamientos estudiados. \*\*\*\* ( $p < 0,001$ ).

## 2.4. RESULTADOS II



**Figura 2.21: Cambios de expresión génica en las DC tras el tratamiento con IAA.** Se cultivaron in vitro las DC wildtype (WT) o AHRd con LPS y IAA durante 24 h. (A) Expresión génica analizada mediante RT-PCR de (A) *Il1b*, (B) *Il6*, (C) *Il12*, (D) *Il23*, (E) *Tgfβ1* y (F) *Tnfα*. Los niveles de expresión de *Gapdh* se usaron para normalizar la expresión del gen de interés ( $\Delta\text{Ct}$ ) y  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  para calcular los cambios en los niveles de ARNm con respecto al tratamiento vehículo. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).

significancia estadística, las DC tratadas con IAA tenían una menor capacidad para inducir la producción de IFN- $\gamma$  e GM-CSF por parte de las células T, según los resultados obtenidos del ELISA. La liberación del IFN $\gamma$  muestra la misma tendencia, aunque su disminución no fue significativa (**Figura 2.22F-H**). Por el contrario, el pretratamiento de las DC con IAA aumentó su capacidad para promover la liberación de IL10 (**Figura 2.22I**).

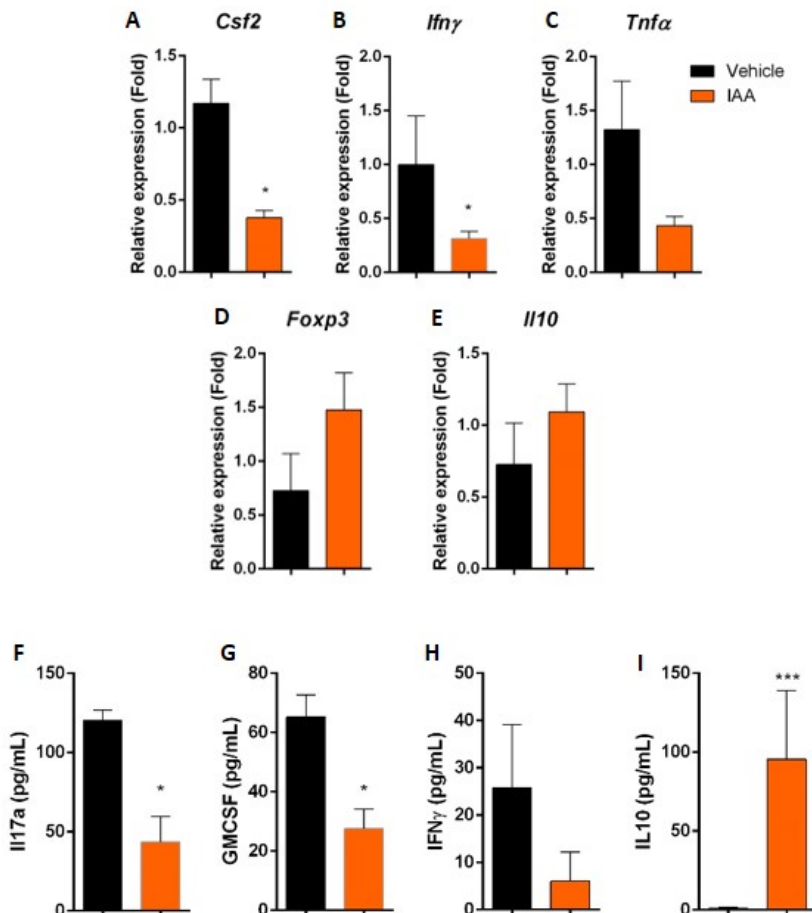
**El IAA afecta la capacidad de las DC para activar y polarizar las células T aumentando la expresión de genes y la liberación de citoquinas que definen el subconjunto de Treg. Así estos resultados sugieren que la activación de Ahr por IAA podría tener un efecto inmunosupresor.**

### 2.4.8. El tratamiento con probióticos productores de IAA con efecto inmunorregulador en la EAE

Para facilitar la absorción intestinal de IAA después de la administración oral, desarrollamos probióticos modificados genéticamente basados en la cepa *E. coli* Nissle (EcN<sup>IAA</sup>), que ya se administra como probiótico terapéutico [587], [588]. Para evaluar la función del promotor inducible por ATC (ver Materiales y Métodos), medimos la cantidad de IAA producido *in vitro* después de la activación de la bacteria. La cepa EcN parental produjo cantidades mínimas de IAA mientras la cepa EcN<sup>IAA</sup> diseñada por ingeniería secretaba cantidades significativas de IAA al medio de cultivo de forma creciente en el tiempo evaluado (**Figura 2.23A**). Para caracterizar la distribución y los efectos biológicos del IAA producido por probióticos, administramos EcN<sup>IAA</sup> o EcN por sonda oral diariamente. En primer lugar confirmamos la viabilidad de la bacteria en heces para ratificar la funcionalidad del tratamiento (**Figura 2.23B**). A continuación, cuantificamos los niveles de IAA en plasma y heces 4 h después de la última administración del probiótico. La administración de EcN<sup>IAA</sup> aumentó los niveles de IAA en ambas muestras biológicas procedentes de los ratones tratados (**Figura 2.23C-D**).

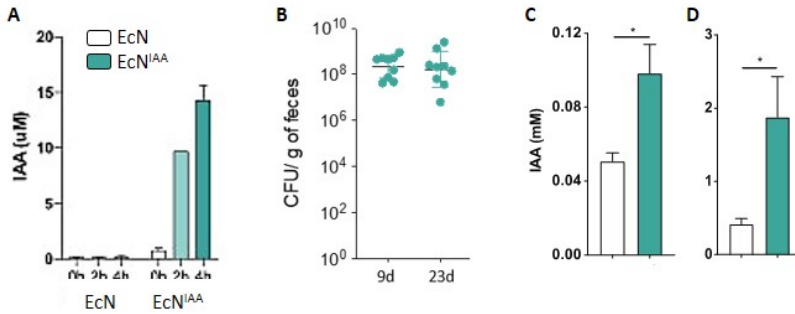
Para evaluar el potencial terapéutico de los probióticos modificados genéticamente basados en la cepa *E. coli* Nissle (EcN<sup>IAA</sup>), administramos EcN<sup>IAA</sup> o EcN

## 2.4. RESULTADOS II



**Figura 2.22: IAA modula la función de las DC *in vitro* al modular la diferenciación de células T efectoras.** Se cultivaron DC *wildtype* junto con LPS y IAA durante 24 h y posteriormente, se cocultivaron con células T CD42D2+ durante 24 h. (A-E) Expresión génica analizada mediante RT-PCR de (A) *Csf2*, (B) *Ifnγ*, (C) *Tnfα*, (D) *Foxp3* e (E) *Il10*. Los niveles de expresión de *Gapdh* se usaron para normalizar la expresión del gen de interés ( $\Delta$ Ct) y  $2^{-\Delta\Delta$ Ct para calcular los cambios en los niveles de ARNm con respecto al tratamiento Vehículo. (F-I) Se analizó la secreción de citoquinas (F) IL17, (G) GMCSF, (H) IFN $\gamma$  e (I) IL10. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ).





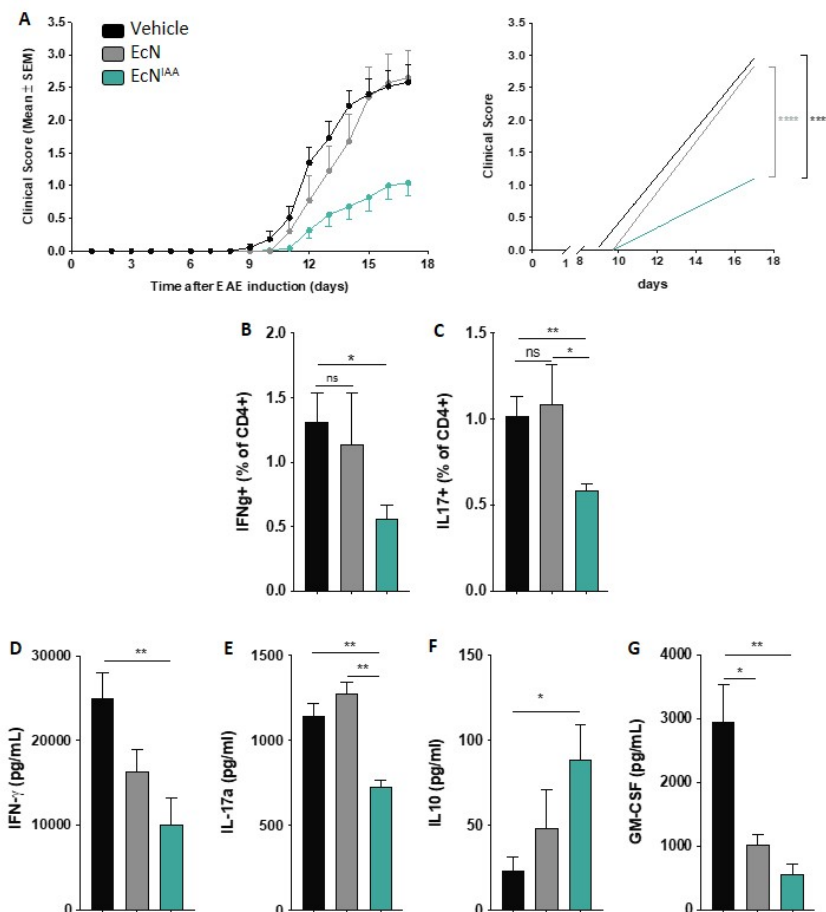
**Figura 2.23: Biodistribución del IAA producido por *EcN*<sup>IAA</sup> (Syn2342).**

(A) Concentración de IAA liberada *in vitro* por la bacteria control (Syn 094) y la productora de IAA (Syn2342) a las 2 h y 4 h. (B) Viabilidad de la bacteria en heces 4 h después de la dosis diaria en los días 9 y 23 de tratamiento. (C-D) Cantidad de IAA medido en (C) suero o (D) heces por la bacteria control (Syn 094) y la productora de IAA (Syn2342) en el día 9 y 4 h tras el tratamiento. Las mediciones de la concentración de IAA se realizaron mediante espectrometría de masas. \* ( $p < 0,05$ ).

diariamente por sonda oral comenzando tres días antes de la inducción de EAE todos los días hasta el día final del experimento. La administración de *EcN*<sup>IAA</sup> disminuyó el desarrollo patológico de la EAE (**Figura 2.24A**), lo que fue concomitante con una disminución de células T proinflamatorias en el SNC CD4+IFN $\gamma$ + y CD4+IL17+ (**Figura 2.24B-C**). Además, analizamos la respuesta recall de los esplenocitos aislados de ratones tratados con estos probióticos mediante la determinación de las citoquinas liberadas al medio. Encontramos que las citoquinas proinflamatorias IL17, IFN $\gamma$  y GM-CSF fueron liberadas en menor cantidad mientras que IL10 mostró un comportamiento opuesto al liberarse en mayor medida en células procedentes de ratones tratados con la bacteria productora de IAA (**Figura 2.24D-G**).

Decidimos aislar las DC del bazo para determinar si los probióticos reducían los signos clínicos de la EAE como consecuencia de una reducción de los niveles inflamatorios a través de la regulación inmune en estas células. Observamos que tras el tratamiento con la bacteria productora de IAA aumentaba el porcentaje

## 2.4. RESULTADOS II



**Figura 2.24: Los probióticos productores IAA suprimen la autoinmunidad del SNC.** (A) Puntuación de la monitorización diaria asignada en función de los signos clínicos de la enfermedad en ratones *wildtype* tratados con el vehículo, bacteria control (EcN) y productora de IAA (EcN<sup>IAA</sup>). Porcentaje de células en el SNC de las subpoblaciones CD4+ que expresan (B) IFN $\gamma$  e (C) IL17. Liberación de citoquinas tras la reactivación de esplenocitos procedentes de ratones tratados con EcN o EcN<sup>IAA</sup> estimulados con MOG 35-55 durante 72 h. Se analizó la concentración en el medio de (D) IFN $\gamma$ , (E) IL17, (F) IL10 y (G) GMCSF. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,001$ ).

de las DC (**Figura 2.25A**). Aprovechamos para confirmar que este tratamiento provocaba cambios en los patrones de expresión génica de esta población celular. Todos los genes proinflamatorios analizados (*Il1b*, *Il6*, *Il12*, *Nos2*, *Tgfβ1* y *Tnfα*) bajaron sus niveles de expresión, aunque solo mostraron significancia estadística *Il1b*, *Il6* y *Nos2* (**Figura 2.25D-I**). Además, decidimos analizar la expresión de *Ahr* y su diana transcripcional, *Cyp1a1*. En ninguno de los dos casos se produjeron diferencias significativas entre la bacteria control y la productora de IAA. No obstante, se aprecia un evidente aumento en la expresión de *Cyp1a1*, lo que podría deberse a la activación del receptor a consecuencia de la probable unión del IAA a la proteína Ahr en las DC (**Figura 2.25B-C**).

**A partir de estos resultados, podemos confirmar la efectividad de los probióticos productores de IAA como tratamiento en el modelo murino de la EAE. Todo parece indicar que posee efectos directos en la funcionalidad de las DC, que en último reducirían la inflamación del SNC ocasionado durante la progresión de la EAE.**

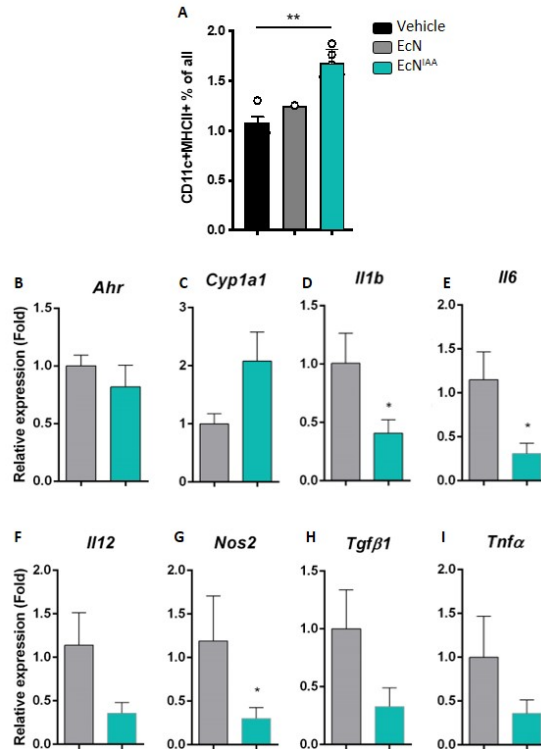
### 2.4.9. EcN<sup>IAA</sup> afecta a la diferenciación de las células T

Para determinar si estos cambios en la proporción y la genética de las DC modificaban de forma directa su función de CPA en el entorno periférico del SNC, cocultivamos las DC las junto con linfocitos T 2D2+CD4+ sin activar (*Naive*). Confirmamos que se redujeron los niveles de citoquinas proinflamatorias *Il17*, *Ifnγ*, *Csf2*, y *Tnfα* (**Figura 2.26A-D**), mientras que las citoquinas *Il10* y *Foxp3* aumentaron su expresión, aunque solo lo hizo de forma significativa *Il10* (**Figura 2.26E-F**).

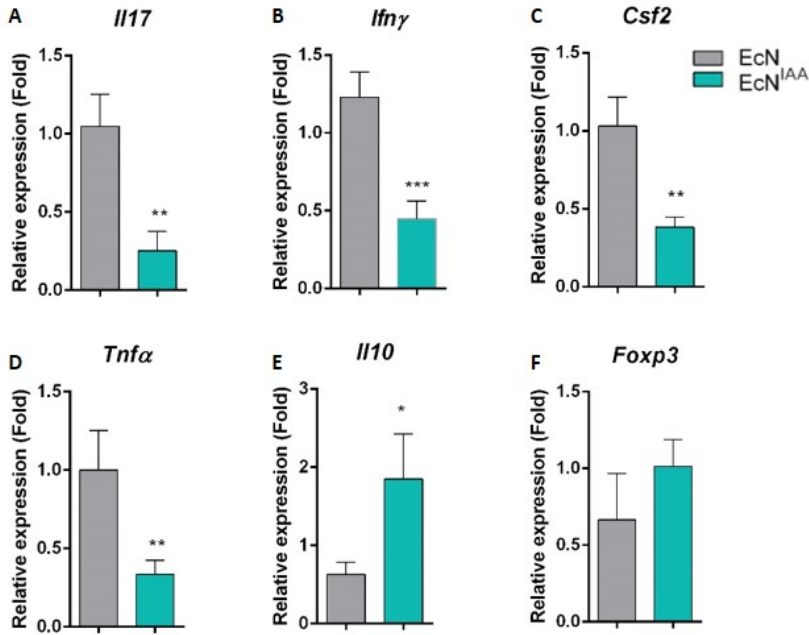
Lo más interesante fue que estos cambios génicos se traducían en aumento de subpoblaciones de células T que expresaban marcadores tolerogénicos como Foxp3 e IL10 (**Figura 2.27A-B**). Como era de esperar la liberación de citoquinas al medio en estos cocultivos fue menor en el caso de las citoquinas proinflamatorias IL17, GM-CSF e IFN $\gamma$ , y superior en el caso de la IL10 (**Figura 2.27C-F**).

Por último, para corroborar que EcN<sup>IAA</sup> alteraba las DC y esto afectaba a la polarización de los linfocitos T efectoras antes de llegar al SNC, aislamos

## 2.4. RESULTADOS II



**Figura 2.25: El tratamiento con EcN<sup>IAA</sup> aumenta la expresión de las DC y disminuye la expresión de genes proinflamatorios.** (A) Porcentaje de células CD11c+MCHII+ aisladas del bazo de ratones tratados con EcN y EcN<sup>IAA</sup> tras ser inducidos para la EAE. (B-I) Expresión génica determinada mediante RT-PCR a partir de las DC aisladas en de (B) *Ahr*, (C) *Cyp1a1*, (D) *Il1b*, (E) *Il6*, (F) *Il12*, (G) *Nos2*, (H) *Tgfβ1* y (I) *Tnfα*. Los niveles de expresión de *Gapdh* se usaron para normalizar la expresión del gen de interés ( $\Delta$ Ct) y  $2^{-\Delta\Delta$ Ct para calcular los cambios en los niveles de ARNm con respecto al tratamiento de la bacteria control EcN. \* (p < 0,05); \*\* (p < 0,01).

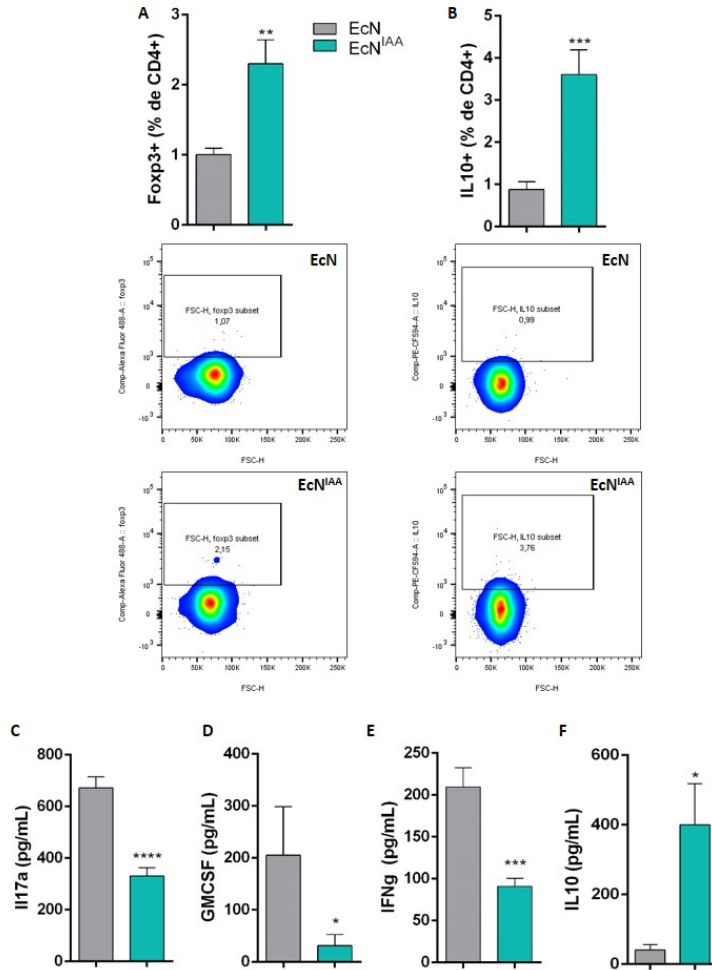


**Figura 2.26:** EcN<sup>IAA</sup> aumenta la expresión de genes propios de Tregs *in vitro*. Se cocultivaron 24 h DC *wildtype* esplénicas junto con células T CD42D2+. Las DC fueron aisladas del bazo de ratones tratados con EcN y EcN<sup>IAA</sup> tras ser inducidos para la EAE. Expresión génica determinada mediante RT-PCR de (A) *Il17*, (B) *Ifn $\gamma$* , (C) *Csf2*, (D) *Tnf $\alpha$* , (E) *Il10* y (F) *Foxp3*. Los niveles de expresión de *Gapdh* se usaron para normalizar la expresión del gen de interés ( $\Delta$ Ct) y  $2-\Delta\Delta$ Ct para calcular los cambios en los niveles de ARNm con respecto al tratamiento de la bacteria control EcN. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ).

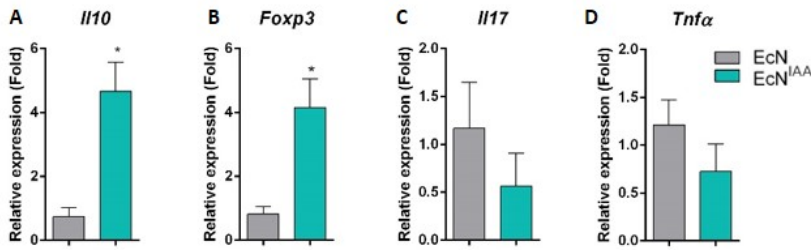
los linfocitos T activados en el bazo. Estas células T activadas mostraron un aumento en los niveles de expresión de las citoquinas reguladoras *Il10* y *Foxp3* (Figura 2.28A-B), y una disminución (no significativa) de la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias *Il17* y *Tnf $\alpha$*  (Figura 2.28C-D).

El tratamiento con probióticos productores de IAA potencia la diferenciación de los Treg a través de su efecto directo sobre las DC. De este modo, este tratamiento potenciaría las respuestas inmunoregula-

## 2.4. RESULTADOS II



**Figura 2.27: EcN<sup>IAA</sup> aumenta la población de células Tregs *in vitro*.** Se cocultivaron 24 h DC *wildtype* esplénicas junto con células T CD42D2+. Las DC fueron aisladas del bazo de ratones tratados con EcN y EcN<sup>IAA</sup> tras ser inducidos para la EAE. Proporción de células T (A) CD4+Fop3+ y (B) CD4+IL10+, y una representación gráfica de los perfiles de FACS obtenidos. Análisis de la liberación de citoquinas en este cocultivo mediante ELISA de (C) IL17, (D) GMCSF, (E) IFN $\gamma$  e (F) IL10. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,005$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,001$ ).



**Figura 2.28:** EcN<sup>IAA</sup> aumenta la expresión de genes característicos de Tregs *in vivo*. Se aislaron células T esplénicas activadas procedentes de ratones tratados con EcN y EcN<sup>IAA</sup> tras ser inducidos para la EAE. Expresión génica determinada mediante RT-PCR de (A) *Il10*, (B) *Foxp3*, (C) *Il17* y (D) *Tnfa*. Los niveles de expresión de *Gapdh* se usaron para normalizar la expresión del gen de interés ( $\Delta\text{Ct}$ ) y  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  para calcular los cambios en los niveles de ARNm con respecto al tratamiento de la bacteria control EcN. \* ( $p < 0,05$ ).

doras reduciendo los niveles inflamatorios en el entorno periférico del SNC.

## 2.4. RESULTADOS II

---



## 2.5. Discusión II

La esclerosis múltiple (EM) se considera una enfermedad predominantemente mediada por células T. Los pacientes con EM albergan en el torrente sanguíneo poblaciones de células T concretas durante largos periodos de tiempo [589]-[591]. Además, el modelo murino de la EAE puede ser producido por la transferencia de poblaciones específicas de células T CD4+ de ratones enfermos a ratones sanos como único evento inductor [592]. Sin embargo, multitud de evidencias encontradas muestran que las células dendríticas (DC) presentan un papel fundamental en el inicio y la progresión de esta afección neurológica.

Las DC se encuentran en el SNC tanto en condiciones normofisiológicas, conformando el sistema de vigilancia inmunológica, como en multitud de procesos inflamatorios neurales [593], [594], incluida la EM [520], [595]. Así se considera factor de riesgo para el desarrollo de EM ciertos alelos del CMHII, en particular el alelo DRB1\*1501 [596], [597]. Además, gracias a trabajos en ratones modelo de la EAE, se ha podido concluir que las CD11c+ por sí solas son suficientes para presentar antígenos a las células T reactivas y mediar la inflamación del SNC resultando en la progresión inicial de la enfermedad [481], [598], [599]. Sin embargo, otros estudios afirman que las DC dependiendo de su ubicación o estado de diferenciación, podrían prevenir el desarrollo de la EAE [600].

En este trabajo hemos demostrado que el factor de transcripción Ahr se induce durante la EAE en DC localizadas en el SNC regulando las poblaciones de células T en este entorno, aumentando la población CD4+ de Tregs y disminuyendo la de CD4+ proinflamatorias. Este primer resultado junto con la combinación de varios factores han supuesto que el receptor de dioxinas sea la diana de estudio en este modelo de EM, ya que presenta un gran impacto en: (1) el desarrollo y la funcionalidad del SNC [601], (2) la regulación inmune en el contexto de diversas patologías [602] y (3) la maduración y función de las DC [254].

En primer lugar, los ligandos de AHR impactan en la proliferación, la diferenciación y la supervivencia neuronal. Estudios empleando los modelos de invertebrados *Caenorhabditis elegans* [603] y *Drosophila melanogaster* [604], han revelado la regulación de estas funciones primordiales en el SNC a través de AHR.

## 2.5. DISCUSIÓN II

---

En vertebrados tomando como modelo el ratón, se ha encontrado que Ahr modifica su expresión génica de forma temporal y espacial en el SNC [605]. Además, AHR es expresado por los astrocitos, las células endoteliales aisladas de la barrera hematoencefálica y las células gliales, regulando la integridad y supervivencia del SNC [606]-[608]. AHR también es expresado por células madre neurales o neuroblastos [609], [610]. No obstante, cabe destacar que la activación de AHR por diversos ligandos puede producir neurodegeneración al desencadenar eventos apoptóticos [611]-[613].

En segundo lugar, diversos modelos de enfermedades inflamatorias y autoinmunes han revelado que la activación de AHR *in vivo* puede suprimir la inflamación. TCDD suprimió las respuestas alérgicas y las enfermedades pulmonares inmunes [614]; la dermatitis atópica [615]; el síndrome de la enfermedad de injerto de células hematopoyéticas [616]; la colitis o enfermedad de Crohn [457], [617]; la diabetes tipo I [431], y la EM [618], entre otras.

En tercer lugar, la capacidad tolerogénica de las DC se considera particularmente importante para controlar y/o apagar las respuestas proinflamatorias patogénicas durante el desarrollo de las enfermedades autoinmunes. En este sentido, se ha demostrado que AHR controla el desarrollo de DC tolerogénicas que promueven la diferenciación de Tregs de una manera dependiente del ácido retinoico y de la indolamina 2,3-dioxigenasa [430], [435], [441], [445]. Además, ciertos subconjuntos de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> expresan mayores niveles tanto de AHR como de CYP1A1 [618], [619]. Varios trabajos han identificado lugares de unión de AHR en los promotores de los genes de las citoquinas, lo que podría modular la expresión génica de éstas [620]-[623], y su activación por TCDD puede revertir la desmetilación de los promotores de la IL-17 [617]. De este modo, la capacidad de AHR para suprimir la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias es un mecanismo esencial. Sin embargo, AHR nunca posee un único mecanismo de acción con una consecuencia universal. Así la polarización de las células T mediada por AHR puede depender del ligando de activación y los subconjuntos de células involucrados. TCDD dio como resultado un aumento de Treg, mientras que FICZ incrementó la polarización de TH17. Estos resultados se manifiestan en la EAE, ya que TCDD disminuyó la gravedad de la enfermedad mientras que

FICZ exacerbó la gravedad de la enfermedad [618], [624]. Otro mecanismo por el que AHR puede disminuir la capacidad para generar células T periféricas es la atrofia tímica, pues su activación por TCDD en DC provoca este proceso [453], [625].

Como se ha comentado anteriormente, las respuestas resultantes de la activación de AHR pueden ser muy divergentes debido a las diferentes interacciones del receptor con otras proteínas o cofactores transcripcionales [626]. Los resultados de este trabajo revelan que AHR puede actuar junto con CD39 en las DC limitando las respuestas de las células T patogénicas y favoreciendo la expansión de las Tregs. Previamente, se había reportado en varias publicaciones que las acciones de CD39 y AHR en células T estaban conectadas e implicadas directamente en la producción de IL10, y por lo tanto, ambos participaban en la diferenciación de estas células en células Tr1 [378], [627], [628].

El papel de CD39 en células T se ha estudiado ampliamente debido a que inicialmente se describió como un marcador de activación de las células linfoides [629] y es ampliamente aceptado que tiene un rol tolerogénico *per se*, tanto en estudios en modelos de ratón como en humanos, pues se expresa constitutivamente en células Treg Foxp3+ [630]. El fenotipo de los ratones *CD39*<sup>-/-</sup> confirma la implicación de esta enzima en la inmunorregulación, pues un rasgo de éstos es la inflamación cutánea exacerbada frente a la exposición a compuestos químicos [374] y la supresión de la proliferación de células T efectoras [397]. En humanos se ha comprobado que los pacientes sometidos a un tratamiento de trasplante de células madre hematopoyéticas, presentan una disminución de células T proinflamatorias Th17 y un aumento de Treg CD39+, y este efecto se traduce en períodos sostenidos de remisión de la EM [631], [632]. En pacientes con enfermedad de Crohn, se ha descubierto una población de células Th17 CD39+ y presentan características tanto reguladoras (es decir, generación de adenosina, función supresora) como proinflamatorias (es decir, bajos niveles de A2A y generación de inosina) [633]. Además, el aumento de TGF- $\beta$  e IL-6 durante la diferenciación *in vitro* de células Th17 induce la expresión de ectonucleotidasas CD39 y CD73, lo que puede dotar a las células Treg de la capacidad de entrar en sitios con elevados niveles de inflamación y mediar respuestas de inmunosupresión al prevenir la muerte celular

## 2.5. DISCUSIÓN II

---

mediada por el receptor P2X7 [634], [635]. Podemos concluir que la expresión de CD39 se puede detectar en un amplio espectro de inmunocitos, donde participa en algunos procesos fisiopatológicos, como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la sepsis, la esclerosis múltiple (EM), las enfermedades alérgicas, la lesión por isquemia-reperfusión (I/R), el lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes y cáncer [636].

No obstante, CD39 parece tener importancia en la regulación de las DC modulando la función de CPA a través de IL27 *in vitro* e *in vivo* a través de STAT3. La señalización de la IL27 en las DC limita la diferenciación de las células T patógenas TH1 y TH17 y el desarrollo de la autoinmunidad del SNC. Otros estudios determinaron que el CD39 en las DC limita esta diferenciación al agotar el eATP y, en consecuencia, reduce la activación del inflamasoma NLRP3 dependiente de P2rX7 y la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18 [380], [507]. Los resultados obtenidos parecen indicar que silenciar CD39 específicamente en las DC provoca un aumento de los niveles inflamatorios aunque también incrementa la expresión de IL27, lo que sería un dato opuesto a la afirmación anterior. Pese a ello, otras publicaciones han mostrado que la IL27 puede potenciar las respuestas de las células T citotóxicas empeorando los trastornos mediados por el sistema inmunitario [637].

En este trabajo evaluamos otras posibles vías de señalización por las que AHR podría modular el entorno inflamatorio en el SNC. Abordamos el estudio en el metabolismo de los PUFA, y concretamente, FADS3. Esta desaturasa se relaciona directamente con la presencia de DHA en el cerebro, el cual es clave en la homeostasis y funcionalidad de este órgano [425], [429], [638]. Cabe destacar que en ratas hembras, FADS3 se transcribía significativamente en mayor medida en algunos tejidos [422], lo que sería relevante en el estudio de la EM al ser una enfermedad que afecta al doble de mujeres que hombres [461]. Sería interesante confirmar si existe este sesgo en su transcripción entre individuos machos y hembras que hayan desarrollado EM.

Durante la neurodegeneración impera un déficit de DHA en el SNC que puede ser compensado por una suplementación a través de la dieta. El DHA tiene propiedades inmunomoduladoras disminuyendo los niveles de citoquinas proinflamatorias en pacientes con EM [639], [640]. Los datos obtenidos en este trabajo

sugieren que el impacto de la señalización de AHR sobre FADS3 en presencia de DHA, podría expandir las poblaciones de Treg principalmente a través de FOXP3 e IL10 en el contexto de la autoinmunidad patogénica del SNC. La existencia de este eje de señalización celular tendría gran relevancia pues FoxP3 Tregs previenen y retrasan el desarrollo de EAE, mientras que el aumento de la relación SNC IL-10+ Treg/Teff durante la resolución de EAE sugiere que las células Tr1 suprimen la inflamación continua del SNC [641]. De hecho, los ratones deficientes en IL-10 no se recuperan de EAE [642].

Existen numerosas evidencias científicas del efecto del DHA sobre la regulación del sistema inmune, demostrándose sus efectos protectores en muchos tipos de afecciones inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide, el asma, la enfermedad de Crohn, la colitis y la psoriasis [582]. Algunos de los mecanismos por los que actúan estos ácidos grasos están directamente relacionados con sus acciones antiinflamatorias, ya que DHA disminuye la síntesis de la prostaglandina proinflamatoria E2 [401] y son precursores de las E-resolvinas y D-resolvinas que suprimen la producción de citocinas inflamatorias [643].

Se ha visto que el tratamiento con DHA en las DC controla su función de CPA, y por lo tanto, de forma indirecta influye en la diferenciación de las células T [411]-[413], [416]. Además, las DC activadas y maduradas con LPS y tratadas con DHA se caracterizaban por reducir su producción de citoquinas [644]. En macrófagos se ha podido comprobar que los PUFA (como el DHA) regulan la expresión génica a través de factores de transcripción como PPAR y NF- $\kappa$ B y/o mediante la producción de eicosanoides, reduciendo la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) [645], lo que tiene gran potencial en reducir los niveles de inflamación durante la obesidad [646]. Curiosamente, se ha demostrado que el tratamiento con TCDD altera in vivo los niveles de eicosanoides en varios órganos del ratón de manera dependiente de AHR, y los propios citocromos P450 inducidos por AHR pueden estar involucrados en el metabolismo de DHA [647], [648].

Hay algunas pruebas de informes de casos y de estudios en animales que sugieren que el efecto del DHA en la microbiota intestinal también puede desempeñar un papel importante como terapia de enfermedades inflamatorias orales y gas-

## 2.5. DISCUSIÓN II

---

trointestinales [649]. La inflamación crónica intestinal suele ser el resultado del aumento de LPS derivado de la disbiosis intestinal, lo que conduce a la activación del inflamasoma y aumento de la expresión de citoquinas inflamatorias. El DHA reduce la producción de LPS y permeabilidad intestinal y, en última instancia, una reducción de endotoxemia metabólica e inflamación [650]. El DHA atenúa el daño intestinal en modelos de colitis porcina y de ratón, y restaura la disbiosis microbiana intestinal aumentando la riqueza de especies y modulando las interacciones microbianas [651], [652]. Por tanto, el tratamiento con DHA podría ser clave para controlar la inflamación periférica del SNC antes de desencadenar la patología de la EM.

Actualmente en este sentido, se está investigando el potencial terapéutico de tratamientos probióticos que modulan y restablecen la microbiota. Recientemente se informó que la administración de probióticos suprimió las respuestas inflamatorias periféricas en pacientes con EM, como lo demuestra la disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras y del CMHII en monocitos y células dendríticas [653]. Algunos de estas moléculas productos de la dieta y la flora comensal actúan como ligandos de AHR regulando su actividad. Por ejemplo, el triptófano es un aminoácido esencial proporcionado por la dieta que se metaboliza en varios ligandos de AHR [584]. Estos ligandos endógenos también se han detectado en el cerebro en condiciones fisiológicas, lo que sugiere que AHR podría desempeñar una función en la homeostasis del SNC [601]. Así niveles reducidos de agonistas de AHR se han relacionado con procesos patológicos neurales como la EM [560], [564], [654]. El metabolismo del triptófano a través de la acción conjunta de la encima IDO y AHR se han vinculado con la inducción de tolerancia inmunológica y la regulación positiva de la polarización Treg versus TH17 [445], [655] y junto con los interferones tipo I activan AHR en los astrocitos y conducen a la supresión de la neuroinflamación [559]. De hecho, los modelos *Ahr*<sup>-/-</sup> o la inhibición de AHR han mostrado una menor diferenciación de Treg [431], [447], [617], [618], [624]. AHR también es capaz de regular a NF- $\kappa$ B y a las proteínas transductoras y activadoras de la transcripción (STAT), lo que enfatiza la profundidad de su rol inmunomodulador [656]-[658]. En conjunto, existen evidencias que respaldan un papel destacado de AHR en el fenotipo tolerogénico y la progresión

de las enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

El análisis de los ligandos de AHR derivados del metabolismo del triptófano (IAA, I3S y TA) en las DC, confirmó que activaban la función transcripcional de la proteína. Anteriormente se había reportado que el tratamiento en las DC con otro metabolito derivado del Trp, ITE, induce la diferenciación de Treg frente a Th17 [659] con efectividad en el modelo de la EAE [660], [661]. Además, se ha demostrado que la activación de AHR en microglía por I3S suprime la expresión de genes proinflamatorios y neurotóxicos y aumenta la expresión de IL10 [583], y la administración de TA atenúa la EAE [662], lo que respalda la capacidad de AHR para limitar la inflamación del SNC. Seleccionamos el IAA, ya que anteriormente no se había evaluado sus efectos en la funcionalidad de las DC y, por consiguiente, la diferenciación de las células T. Encontramos que la activación de Ahr en DC con IAA disminuyó la diferenciación de los T efectores. Además, cabe destacar el papel dual de AHR, pues no está claro cómo algunos de sus ligandos, por ejemplo TCDD, puede ser beneficioso para suprimir las respuestas autoinmunes en modelos animales de EM [618] y al mismo tiempo ser altamente tóxico y cancerígeno. Sin embargo, parece que los ligandos procedentes de la dieta y/o endógenos, son beneficiosos para mantener la homeostasis del sistema inmunitario [602] y no se han reportado efectos perjudiciales para la salud del individuo.

Estos resultados *in vitro* del tratamiento con IAA en las DC, fueron respaldados por la activación terapéutica de Ahr a través del tratamiento con probióticos productores de este metabolito ( $EcN^{IAA}$ ), lo que indujo un fenotipo tolerogénico en el entorno periférico y el propio SNC. Los tratamientos con probióticos en enfermedades autoinmunes como la EM tienen varias ventajas: (1) desregulación en los géneros bacterianos que constituyen el microbioma, pues estos pacientes con EM muestran una mayor abundancia de géneros bacterianos como Akkermansia y Methanobrevibacter, mientras que géneros como Parabacteroides y Butyrivimonas tienen una abundancia menor [539], [663], [664]; (2) los microorganismos endógenos o exógenos regulan el sistema inmune, y concretamente, se conocen mecanismos por los cuales los parásitos modulaban directamente la función de las DC [665]; (3) puede ser una estrategia eficaz para lograr una administra-

## 2.5. DISCUSIÓN II

---

ción oral evitando las barreras fisicoquímicas del tracto gastrointestinal, como los ácidos gástricos, la capa mucosa intestinal o la degradación enzimática que puedan alterar o dañar la composición de los tratamientos [666]. Otra estrategia para conseguir la estabilidad gastrointestinal y dirigida a la modulación de la señalización de AHR fue el uso de nanoliposomas cargados con ITE, los cuales suprimieron las respuestas patogénicas en la EAE [667]. Otro aspecto a tener en cuenta considerando que el EM afecta más al sexo femenino, y que puede ser clave para incorporar el uso de probióticos en el tratamiento de la EM, es el hecho que la composición de la microbiota intestinal presenta propiedades de dimorfismo sexual, encontrándose en hembras un entorno más inmunorreactivo en el eje intestino-SNC [668].

Un enfoque prometedor para el tratamiento de trastornos autoinmunes sería poder controlar y aumentar la generación de células inmunes tolerogénicas que controlen el entorno inflamatorio. En estos momentos se está viendo la eficacia potencial de Laquinimod, un ligando de AHR, en el tratamiento clínico de la EM así como la enfermedad de Huntington, al mediar los efectos antiinflamatorios en células gliales [669], [670]. De este modo, con las evidencias encontradas en este trabajo y otros, podemos concluir que comprender la señalización de AHR en las DC y saber cómo afecta a la regulación de las respuestas inmunitarias adaptativas en la EM, ayudaría al desarrollo de una nueva y prometedora generación de tratamientos basados en la inmunoterapia.



## 2.6. Conclusiones I / Conclusions I

### Conclusiones II:

1. Ahr se induce en las células dendríticas (DC) durante el desarrollo del EAE y regula la señalización celular en estas células para limitar la inflamación en el SNC.
2. En las DC existe una relación directa de Ahr con CD39 en el SNC en el entorno patológico de la EAE. La consecuencia de esta interrelación es la reducción del entorno proinflamatorio presente en la EAE.
3. Ahr actúa como interfaz innumometabólica al relacionarse con la actividad de la desaturasa FADS3 en las DC. La acción de esta enzima a través del metabolismo del DHA limita las respuestas proinflamatorias en las DC y potencia las inmunorreguladoras.
4. Los metabolitos endógenos derivados del Trp y producidos por la microbiota intestinal modulan la señalización de Ahr en las DC, siendo el IAA un candidato potencial para controlar las respuestas de las DC en la diferenciación y expansión de la población de células T tolerogénicas.
5. El tratamiento con probióticos productores de IAA posee efectos directos en la funcionalidad de las DC, las cuales sesgan las poblaciones de células T diferenciadas hacia un fenotipo de Treg.
6. Los probióticos productores de IAA aminoran la patogenia de la EAE. Así estos probióticos dirigidos a activar la señalización de Ahr pueden ser una estrategia terapéutica prometedora para tratar pacientes con EM.
- 7.

## 2.6. CONCLUSIONES I / CONCLUSIONS I

---

### Conclusions II:

1. Ahr is induced in DC during EAE development and regulates cell signaling in these cells to limit inflammation in the CNS.
2. There is a direct relationship of Ahr with CD39 in DC in the pathological context of the CNS during EAE. The consequence of this interrelation is the reduction of the proinflammatory environment present in EAE.
3. Ahr acts as an immunometabolic interface by being related to FADS3 desaturase activity in DC. The action of this enzyme through the metabolism of DHA limits proinflammatory responses in DC and enhances immunoregulatory responses.
4. Endogenous metabolites derived from Trp and produced by the intestinal microbiota modulate Ahr signaling in DC- IAA is a potential candidate to control DC function in the differentiation and expansion of the population of tolerogenic T cells.
5. Treatment with IAA-producing probiotics has direct effects on DC functionality, biasing differentiated T cell populations toward a Treg phenotype.
6. IAA-producing probiotics reduce the pathogenesis of EAE. Thus, these probiotics targeting Ahr signaling may be a promising therapeutic strategy to treat MS patients.

## 2.6. CONCLUSIONES I / CONCLUSIONS I

---

# Materiales y Métodos

## 1. Modelos animales

En el **CAPÍTULO I** todos los experimentos que implicaron el uso de animales fueron desarrollados de acuerdo con (1) la legislación Europea (Directiva de la EU 86/609/CEE modificada por la directiva 2003/65/CE), (2) la legislación Nacional (Real decreto RD53/2013) y (3) siguiendo las normas del Instituto para los Recursos en Animales de Experimentación (ILAR). Los protocolos experimentales empleados fueron aprobados por el Comité de Bioética para la Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura (protocolo 109/2014) y por la Junta de Extremadura (expediente EXP-20160506-1). Estos ratones fueron mantenidos en las instalaciones del animalario de la Universidad de Extremadura respetando las condiciones de temperatura, humedad y acceso libre a comida y agua. A continuación, describimos brevemente las cepas de ratones empleadas:

**a. *Wildtype* o silvestres (*Ahr*<sup>+/+</sup>) y *Ahr knock-out* (*Ahr*<sup>-/-</sup>):** Los ratones silvestres (*Ahr*<sup>+/+</sup>) y mutantes para *Ahr* (*Ahr*<sup>-/-</sup>) utilizados en esta tesis doctoral, son del fondo genético mixto C57BL6/N x 129/Sv. Los ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> fueron producidos por recombinación homóloga en células embrionarias (ES). El gen de resistencia a neomicina fue insertado sustituyendo el primer exón del locus de *Ahr*, interrumpiendo el marco de lectura e impidiendo por tanto la expresión del receptor de forma constitutiva en todas las células del organismo

## 1. MODELOS ANIMALES

---

[12].

**b. R26R-YFP:** Los ratones mutantes R26R-YFP fueron cedidos amablemente por la Dra. Mercedes Ricote (CNIC). Estos ratones poseen un *cassette* LSL seguido del gen de la proteína amarilla fluorescente (YFP) insertado en el locus Gt(ROSA)26Sor por recombinación homóloga. Previamente fueron cruzados con ratones que expresan la Cre recombinasa. De esta forma se elimina la secuencia de STOP y se expresa la proteína fluorescente (**Figura 1**). Estos ratones dobles mutantes son útiles para rastrear y monitorizar células en diversos modelos experimentales [671]. En nuestras instalaciones fueron cruzados con ratones *Ahr+/+* y *Ahr-/-* con el fin de obtener ratones silvestres y mutante para Ahr que expresen de forma constitutiva la proteína YFP.

En el **CAPÍTULO II** todos los protocolos llevados a cabo empleando animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (*Institutional Animal Care and Use Committee*, IACUC) del Brigham and Women's Hospital siguiendo la normativa aprobada por las autoridades competentes en el estado de Massachusetts (EEUU). Los animales se mantuvieron en una instalación libre de patógenos en el edificio Hale Building for Transformative Medicine del Brigham and Women's Hospital respetando las condiciones de temperatura, humedad y acceso libre a comida y agua. Todas las cepas de ratón fueron obtenidas del Laboratorio Jackson. A continuación, describimos brevemente las cepas de ratones empleadas:

**a. Wildtype o silvestres:** Los ratones carentes de modificación genética fueron suministrados por el Laboratorio Jackson a demanda de cada experimento concreto.

**b. Zbtb46<sup>Cre</sup> AhR<sup>fl</sup>:** Zbtb46 es un factor de transcripción restringido a células dendríticas clásicas que no se expresa en otras poblaciones de células inmunitarias, incluidas las células dendríticas plasmocitoides, los monocitos o los macrófagos. Los ratones Zbtb46<sup>Cre</sup> se cruzaron con ratones AhR<sup>fl</sup> para obtener ratones carentes específicamente de la expresión de Ahr en CD.

**c. Itgax<sup>Cre</sup> CD39<sup>fl</sup>:** El promotor de CD11c (Itgax) dirige la expresión de la proteína bicistrónica Cre a las CD. Cuando se cruzó con un ratón CD39<sup>fl</sup>, el cual contiene la secuencia de CD39 flanqueada por loxP, la descendencia resultante

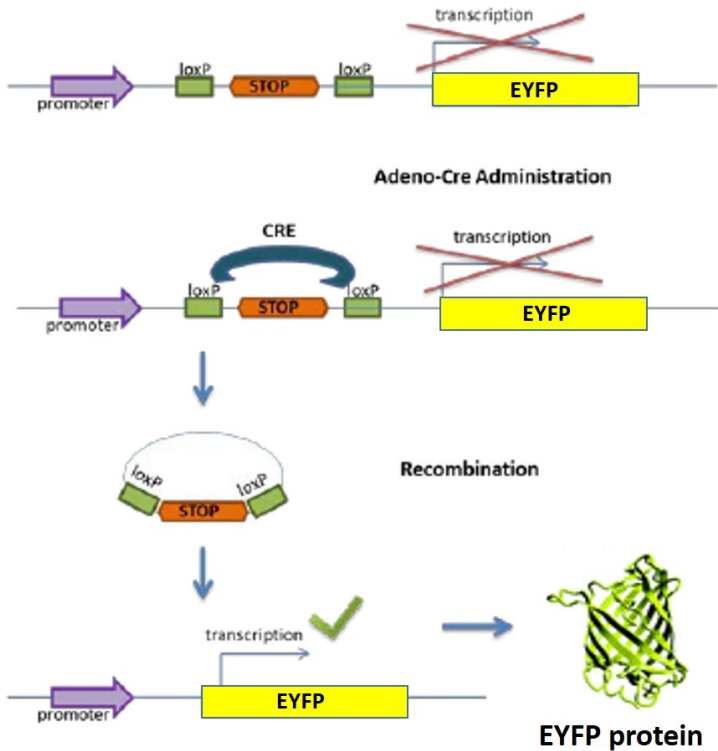


Figura M.1: Esquema de la modificación genética en la que se basa el modelo murino R26R-YFP.

mediante la recombinación mediada por Cre de la secuencia flanqueada carece de la expresión de CD39 en CD.

**d. *Fads3*<sup>-/-</sup>:** Se generaron los ratones carentes de *Fads3* mediante el reemplazo de la secuencia de *Fads3* por la construcción de un vector (contiene un aceptor de corte y empalme (SA) seguido del marcador de selección positivo lacZ y el gen de resistencia a la neomicina) mediante recombinación homóloga [425].

**e. *AhRd*:** El alelo *d* de *Ahr* de la cepa DBA/2 difiere del alelo *b-1* presente en la cepa C57BL en 10 nucleótidos, cinco de los cuales representan cambios de aminoácidos. Este cambio provoca que *Ahr* tenga una afinidad de unión 10

## 2. GENOTIPADO

---

veces menor por sus ligandos, por lo que requieren una dosis 10 veces mayor de ligando que el alelo *Ahrb-1*, presente en ratones C57BL/6N, para provocar efectos similares. Se llevaron a cabo diversos cruces entre ambas cepas para obtener la isoforma AhRd en el fondo C57BL/6N [672].

**f. 2D2 TCR:** Estos ratones expresan un receptor de células T (TCR) específico de la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG). Sus células T son funcionalmente competentes. La mayoría de los timocitos y esplenocitos en ratones 2D2 TCR expresan niveles altos e intermedios del receptor TCR. Estos ratones pueden ser útiles en estudios inmunológicos para investigar el papel y la naturaleza de la reacción autorreactiva específica a MOG, las poblaciones de células T, así como para estudiar el desarrollo de la autoinmunidad en el SNC. Concretamente, en este trabajo los empleamos para cocultivar las células T CD4+ junto con las CD.

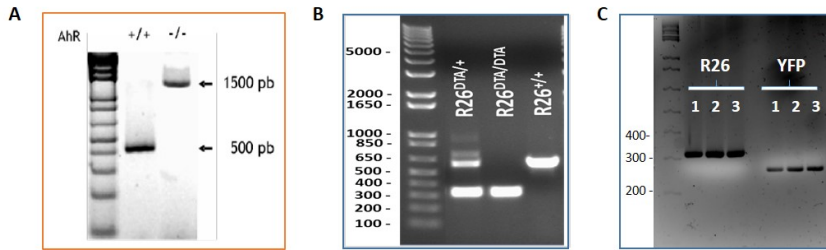
**g. P65 reportero (FVB.Cg-Tg (HIV-EGFP, luc) 8Tsb/J):** Estos ratones transgénicos NGL (NF- $\kappa$ B-GFP-luciferasa) actúan como un indicador de actividad de NF- $\kappa$ B, expresando una proteína de fusión de proteína fluorescente verde-luciferasa impulsada por NF- $\kappa$ B.

## 2. Genotipado

El genotipado de los ratones empleados en el **CAPÍTULO I** se llevó a cabo siguiendo las siguientes estrategias:

**a. Modelo *Ahr knock-out* (*Ahr*<sup>-/-</sup>):** El genotipo de los ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> y *Ahr*<sup>-/-</sup> se llevó a cabo mediante PCR empleando DNA genómico extraído de una biopsia de la cola de animales adultos. Para extraer el DNA, el tejido se incubó con 500  $\mu$ l tampón de extracción de DNA genómico (Tris-HCl 100 mM pH 8.5, EDTA 5 mM, SDS 0,2% (p/v), NaCl 200 mM, Proteinasa K 100  $\mu$ g/ml) en agitación durante 16 h a 55°C. Se centrifugó el lisado celular y se descartó el *pellet* con los restos no disgregados. A continuación, el DNA se precipitó añadiendo el mismo volumen de isopropanol. El DNA precipitado se lavó en 500  $\mu$ l de etanol al 80% (v/v), se centrifugó y se dejó secar. Por último, se resuspendió en 50-100  $\mu$ l de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM).





**Figura M.2: Fragmentos de PCR correspondientes a las diferentes estrategias de genotipado.** (A) Procedentes de ratones *Ahr*<sup>+/+</sup> y *Ahr*<sup>-/-</sup>. El genotipo silvestre corresponde a una banda de 500 pb mientras que el mutante corresponde a una banda de 1500 pb. (B-C) Procedentes de ratones ratones R26-YFP. El genotipo *knock-in* corresponde a una banda de 350 pb mientras que el silvestre corresponde a una banda de 600 pb. En la imagen (B) aparece un individuo heterocigoto, un *knock-in* y un silvestre, respectivamente. En la imagen (C) se presenta el genotipo de 3 ratones R26-YFP mostrando el producto de la PCR para el *cassette* R26 y para el gen YFP.

Este DNA se utilizó como molde en una reacción de PCR con unos oligonucleótidos (WT2 + WT5) que hibridan en las secuencias flanqueantes a la región en la que el gen de *Ahr* fue inactivado por inserción del gen de resistencia a neomicina (Neo) (**Tabla 1**). De este modo, el análisis de los productos de PCR generados permite detectar un fragmento de 1500 pb en el caso del alelo mutado y de 500 pb cuando se trata del alelo silvestre (**Figura 2A**).

**b. Modelo murino R26R-YFP:** El genotipado de los ratones R26R-YFP se llevó a cabo empleando DNA genómico de biopsias de la cola según se ha indicado anteriormente. Además de identificar el genotipo de *Ahr*, se llevó a cabo un segundo análisis por PCR para confirmar la presencia del *cassette* R26 conteniendo el gen YFP. Se realizaron dos reacciones de PCR diferentes, una optimizada para detectar el *knock-in* del *cassette* de R26 y otra para el YFP (**Figura 2B-C**). En la **Tabla 1**, se detallan los cebadores utilizados, así como las condiciones de PCR y el tamaño de los fragmentos esperados.

La primera parte del genotipado de las diferentes cepas de ratones empleadas

### 3. MODELO DE REGENERACIÓN HEPÁTICA: HEPATECTOMÍA PARCIAL

---

**Tabla M.1: Secuencia de oligonucleótidos cebadores y condiciones del genotipado de los ratones empleados en el CAPÍTULO I.** La combinación de oligonucleótidos en las reacciones de PCR son: WT2+5; IMR183+316+315; y YFP1+2.

Oligo	Secuencia (5'-3')
WT2	GGCTAGCGTGCGGGTTTCTC
WT5	CTAGAACGGCACTAGGTAGGTCAG
IMR883	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
IMR316	GGAGCGGGAGAAATGGATA
IMR315	GCGAAGAGTTTGTCTCAAC
YFP1	ATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC
YFP2	GTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGT

en el **CAPÍTULO II**, que consiste en la obtención de biopsias de tejido de la oreja, la llevaron a cabo técnicos del laboratorio del Dr. Francisco J. Quintana y del servicio de animalario del Brigham and Women's Hospital. La segunda parte del protocolo lo llevó a cabo la empresa Transnetyx, la cual brinda servicios de PCR de genotipado automatizado.

### 3. Modelo de regeneración hepática: hepatectomía parcial

La hepatectomía parcial se llevó a cabo utilizando el procedimiento estándar de acuerdo con el protocolo publicado por Mitchell y Willenbring [673]. La hepatectomía parcial se realizó entre las 8 y las 12 horas de la mañana. Los ratones se anestesiaron mediante inhalación con isoflurano. Se realizó una pequeña incisión en el abdomen para abrir la cavidad peritoneal. Se hicieron dos cortes para liberar el hígado del ligamento falciforme y la membrana que une el caudado y el lóbulo lateral izquierdo. A continuación, se colocó hilo de seda 4-0 (Ethicon, SA10) en la base del lóbulo izquierdo, se ató un nudo doble y se eliminó este lóbulo. Luego se procedió del mismo modo con el lóbulo mediano colocando el

### 3. MODELO DE REGENERACIÓN HEPÁTICA: HEPATECTOMÍA PARCIAL

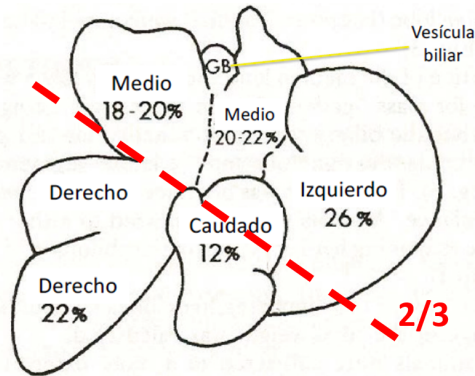


Figura M.3: Esquema de la cirugía llevada a cabo en el modelo de hepatectomía parcial 2/3.

hilo justo encima de la vesícula biliar, y se procedió a eliminar este tejido para completar la resección de 2/3 del tejido hepático del ratón ((**Figura 3**)). Finalmente, se cerró el peritoneo y la piel con sutura 5-0 (Ethicon, JV389). Se realizó la misma cirugía sin ligadura y resección de ningún lóbulo en ratones en el grupo de operación simulada o *sham* (control).

Se determinó el peso corporal del ratón y del hígado en una balanza de laboratorio para establecer el ratio hígado/peso a los diferentes tiempos estudiados después de la cirugía. Para medir el peso del hígado, solo se pesaron los lóbulos intactos evitando todo resto de tejido remanente de los lóbulos que fueron eliminados. Además, se tomaron fotos del lóbulo lateral derecho sobre un papel milimetrado para comparar de *visu* la regeneración entre los diferentes tiempos y genotipos. Posteriormente, para cuantificar el proceso regenerativo en estas imágenes, se determinaron el número de píxeles de la diagonal mayor de estos lóbulos mediante el programa de edición fotográfica GIMP. En el momento de la necropsia, se recogió sangre mediante punción cardíaca antes de la extracción del tejido hepático. A continuación, los hígados remanentes se dividieron homogéneamente para utilizar siempre la misma porción para fijar en formaldehído al 4% y congelar a -80 °C inmediatamente después de la necropsia.

#### 4. TRASPLANTE DE HEPATOCITOS PRIMARIOS A TRAVÉS DEL BAZO

---

### 4. Trasplante de hepatocitos primarios a través del bazo

En 1997 Sutherland y colaboradores [674], demostraron que el trasplante de hepatocitos aumenta significativamente la supervivencia de ratas con insuficiencia hepática aguda grave. En este modelo el trasplante de hepatocitos se llevó a cabo a través del bazo. El bazo se considera el mejor lugar para el implante de los hepatocitos, y es la localización utilizada más frecuentemente para el trasplante. Entre el 50-85 % de los hepatocitos inyectados en el bazo migran al hígado a través de la vena esplénica y allí quedan retenidos en los lobulillos hepáticos [325].

Los hepatocitos a trasplantar fueron aislados mediante la técnica de digestión enzimática con colagenasa perfundida, como se explica en el siguiente apartado, de ratones R26R-YFP-*Ahr*<sup>-/-</sup>. Una fracción de las células hepáticas obtenidas se fijó y se conservó como control para el análisis posterior.

Después de la inducción de la anestesia y tras la hepatectomía parcial 2/3 completada, se coloca el ratón sobre el costado derecho y, se realiza una pequeña incisión en la piel y el peritoneo para exponer la región donde se localiza el bazo. El trasplante se llevó a cabo a través de la zona apical del bazo con una aguja de 25G. Se trasplantaron 200.000 células resuspendidas en medio DMEM mantenidas en hielo hasta el momento de la intervención. Después de la infusión de las células se retira la aguja y se sutura el peritoneo y la piel en dos planos. Tras la intervención se mantiene al animal sobre una manta térmica hasta que recupera la consciencia tras la anestesia. A las 48 horas se llevó a cabo la necropsia de los individuos sometidos a la hepatectomía seguida del trasplante de células hepáticas. Se tomaron fotos del lóbulo lateral derecho y se analizó el proceso regenerativo como se expuso anteriormente. Todo el tejido extraído se disgregó y mediante citometría de flujo se determinó el porcentaje de células que expresaban fluorescencia. Además, se comparó este porcentaje de fluorescencia con las células obtenidas en el momento de la digestión enzimática. También disgregamos el bazo para confirmar que las células habían migrado desde este órgano.

## 4. TRASPLANTE DE HEPATOCITOS PRIMARIOS A TRAVÉS DEL BAZO

---

**Tabla M.2: Medios empleados para la obtención de células hepáticas mediante digestión enzimática con colagenasa.** La colagenasa se añade al medio de perfusión II justo antes de empezar el protocolo para evitar que se inactive la enzima.

<b>Etapas (Volumen de perfu- sión)</b>	<b>Solución empleada (Suplementos)</b>
Perfusión I (aprox. 10 ml)	Medio HBSS sin calcio ni magnesio ni rojo fenol (500 ml): +5 ml 1M HEPES pH 7.4 +38 mg EGTA
Perfusión II (aprox. 50 ml)	Medio Williams'E (500 ml): +5ml 1M HEPES pH 7.4 +Colagenasa Tipo I 0,05% (Wortington M3A14008B).

### 4.1. Obtención células hepáticas primarias

El aislamiento de hepatocitos primarios de ratón se llevó a cabo utilizando la técnica de perfusión hepática en dos pasos con colagenasa (**Tabla 2**).

Los ratones utilizados para la obtención de hepatocitos primarios se encontraban en edad adulta. El protocolo consta de los siguientes pasos:

1. El ratón es anestesiado con una inyección i.p. de ketamina/xilacina (4:1) diluida en PBS empleando una aguja de 25G. La dosis de la solución diluida es de 25 ml/kg de peso del animal.
2. Se coloca el animal sobre la mesa de operaciones boca arriba fijando las extremidades y se aplica alcohol en el área quirúrgica.
3. Se practica una incisión a la altura de la zona inferior del abdomen y se abre la cavidad abdominal hasta el tórax.
4. Se desplazan los intestinos hacia la derecha hasta localizar la vena porta.

#### 4. TRASPLANTE DE HEPATOCITOS PRIMARIOS A TRAVÉS DEL BAZO

---

5. Se realiza un nudo alrededor de la vena cava inferior a la altura de los riñones con hilo de sutura (2/0) que se deja sin apretar.
6. Posteriormente, se abre el diafragma y las costillas para visualizar la vena cava inferior a la altura del corazón.
7. Se canula la vena cava infrahepática evitando alcanzar el hígado mediante un catéter BD Insyte® (24 GA 0,7x19 mm). Si se ha canulado correctamente la vena se aprecia que la vena porta aumenta de calibre. Entonces se cierra el nudo realizado previamente en la vena cava para fijar el catéter (si existen signos de que la canulación no se ha realizado correctamente se puede variar el procedimiento como se menciona al final del protocolo). En este punto, se debe actuar con rapidez para evitar que la sangre se quede estancada en el hígado.
8. Se realiza un corte en la vena porta para dejar salir la sangre y aliviar la presión generada. Para mejorar la eliminación de sangre del hígado se corta la circulación de la vena cava suprahepática con la ayuda de una pinza clamp (Figura M. 5.). Se perfunde el hígado durante 2-4 minutos con Medio de perfusión I. El tiempo de perfusión se ajusta hasta observar el hígado limpio de sangre circulante.
9. A continuación, se perfunde con el Medio de perfusión II (volumen final ajustado al genotipo del ratón) que contiene la colagenasa que llevará a cabo la rotura de las uniones entre los hepatocitos y la disgregación de los mismos. La perfusión se realiza a 37°C, pH 7.4 y a un flujo de 2,5 ml/min (Perfusión I) y 4-5 ml/min (Perfusión II) (Tabla M. 2.).
10. Terminada la perfusión, se escinde el hígado de la cavidad abdominal y se coloca en una placa de Petri con medio de cultivo frío en hielo.
11. A partir de este punto todo el proceso se realiza en condiciones de esterilidad, bajo campana de flujo laminar y en hielo. Se disgrega cuidadosamente el hígado con la ayuda de dos pinzas estériles.

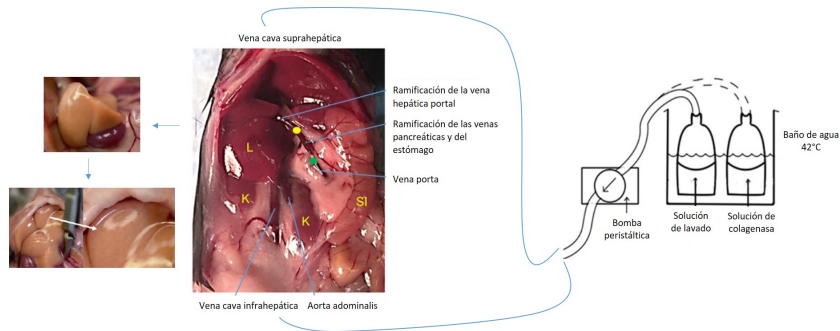
#### 4. TRASPLANTE DE HEPATOCITOS PRIMARIOS A TRAVÉS DEL BAZO

---

12. Se filtra a través de una malla de nylon de 70  $\mu\text{m}$  y el filtrado se recoge en un tubo de 50 ml. Se lava varias veces la placa para recoger la mayor cantidad posible de células.
13. Se centrifuga a 200 G durante 5 min a 4°C.
14. Se resuspende el precipitado celular cuidadosamente con 25 ml de medio de cultivo frío y se repite la centrifugación varias veces hasta ver el medio claro y libre de células.
15. Se lleva a cabo el conteo celular y se determina la viabilidad descartando las células muertas teñidas con el colorante vital Trypan Blue (proporción 1:1). Para ello se emplea el contador de células *Cell counter* (Bio-Rad).
16. Se siembran los hepatocitos en placas de cultivo según la necesidad del experimento.
17. A las 3-4 horas se retira el medio con células muertas y restos de la digestión enzimática que hubieran quedado. Los hepatocitos primarios aislados se dejan en medio completo *overnight* antes de empezar el experimento. Las células se mantienen en un incubador en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37°C.

Los ratones *Ahr*<sup>-/-</sup> presentan elevada fibrosis y defectos en la vascularización hepática, lo cual puede perjudicar la obtención de hepatocitos primarios mediante este protocolo. En estos ratones se puede variar este protocolo para obtener mayor eficiencia: realizar la perfusión siguiendo un flujo anterógrado, es decir, canular la vena cava suprahepática y cerrar la circulación de la vena cava infrahepática una vez iniciada la perfusión. También se puede recurrir a esta estrategia si se rompe la vena cava infrahepática al intentar canularla.

## 5. AISLAMIENTO DE CÉLULAS HEPÁTICAS CON FENOTIPO INDIFERENCIADO (*STEM-LIKE*): *SIDE POPULATION*



**Figura M.4: Esquema de la perfusión hepática llevada a cabo para obtener los cultivos primarios de hepatocitos de ratón.** Si la vena está canulada correctamente, al cortar la vena porta, el hígado adquirirá un color pálido. Se debe finalizar la perfusión cuando se aprecie que el tejido está perdiendo la integridad debido a la actividad enzimática de la colagenasa.

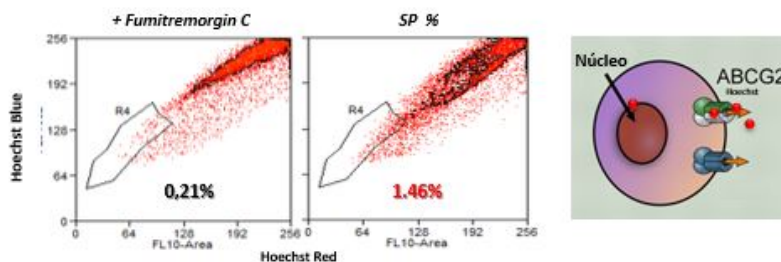
## 5. Aislamiento de células hepáticas con fenotipo indiferenciado (*stem-like*): *Side Population*

ABCG2 es un miembro de los transportadores de *cassette* de unión a ATP (ABC), que pueden bombear una amplia variedad de compuestos endógenos y exógenos fuera de las células (**Figura 5**). Ampliamente se ha visto que se encuentra expresado en células madre, por lo que se reconoce como un marcador universal de esta población [675]. Así la *Side Population* (SP) se trata de una subpoblación de células con características de célula madre indiferenciada (*stem-like*).

Esta población celular se aisló a partir de la totalidad de células procedentes del hígado de ratones *Ahr+/+* y *Ahr-/-*. Los ratones fueron sacrificados y los hígados extraídos y transferidos a tubos conteniendo medio completo DMEM suplementado con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina 1%. Estos tejidos fueron entonces disgregados mecánicamente en un equipo gentleMACS™ Octo Dissociator (Miltenyi). La suspensión resultante se filtró a través de filtros de 30  $\mu\text{m}$  y se centrifugó durante 5 min a 500 G. Una vez retirado el sobrenadante,



## 6. OBTENCIÓN DE PLASMA SANGUÍNEO



**Figura M.5: Aislamiento de células madre *Side Population*.** Se muestran los perfiles de FACS obtenidos en el hígado de un ratón silvestre y un esquema de la bomba de extrusión ABCG2.

el precipitado obtenido se resuspendió en PBS conteniendo  $5 \mu\text{g/ml}$  de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) y se tiñeron durante 90 min a  $37^\circ \text{C}$ . Posteriormente, las células se centrifugaron, se resuspendieron en tampón HEPES-HBSS y se incubaron con fumitremorgin C a una concentración  $50 \mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich) con el fin de inhibir la bomba de extrusión ABCG2, lo que serviría como control de que el protocolo estaba funcionando (**Figura 5**). Para la discriminación de las células muertas, se empleó una tinción con yoduro de propidio  $10 \text{ nM}$ . Para cuantificar las subpoblaciones con características SP se usaron los marcadores CD133+, CD44+ y CD29+. Para estos análisis se empleó el citómetro de flujo MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter) en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura.

## 6. Obtención de plasma sanguíneo

Antes de sacrificar los animales se pasó a través de las agujas, jeringas y tubos una solución anticoagulante conteniendo EDTA. Una vez sacrificados, las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca ventricular empleando una aguja de 25G. Las células se separaron del plasma mediante centrifugación a  $1500 \text{ G}$  durante 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . El plasma se llevó a un tubo fresco y se almacenó

## 7. MEDIDA DE LA GLUCOSA EN SANGRE

---

inmediatamente a  $-80^{\circ}$  C hasta su análisis.

### 7. Medida de la glucosa en sangre

Se midieron los niveles de glucosa realizando un pequeño corte en la punta de la cola suficiente para obtener una gota de sangre. Para obtener la medida se utilizó un glucómetro comercial (GlucoLeader-yasee GLM-76, HMD BioMedical).

### 8. Medida de la actividad Hexoquinasa

Para estudiar el metabolismo de la glucosa, se utilizó el *Picoprobe Hexokinase activity assay kit* (Biovision) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el análisis de consumo de glucosa en hígado, se homogenizaron 30 mg de tejido en 300  $\mu$ l de buffer HK frío utilizando un homogeneizador manual. Tras centrifugar a 10.000 G y  $4^{\circ}$  C durante 5 min, se recogió el sobrenadante que fue utilizado para llevar a cabo el protocolo establecido en las instrucciones.

### 9. Modelo de la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE)

La EAE fue inducida por inmunización con 150  $\mu$ g del péptido MOG35–55 (Genemed Synthesis Inc., ref. 110582) mezclado con adyuvante de Freund completo recién preparado (usando 20 ml de adyuvante de Freund incompleto (BD Biosciences, ref. BD263910) mezclado con 100 mg de M. Tuberculosis H-37Ra (BD Biosciences, ref. 231141) en una proporción de 1:1 (v/v a una concentración de 5 mg/mL). En el día de la inducción (día 0) todos los ratones recibieron 2 inyecciones subcutáneas de 100  $\mu$ L cada una de la mezcla MOG/CFA y una inyección intraperitoneal única de toxina pertúsica (List Biological Laboratories, ref. 180) a una concentración de 2 ng/ $\mu$ L en 200  $\mu$ L de PBS. Los ratones recibieron una segunda inyección de toxina pertúsica a la misma concentración dos días después de la inducción inicial de EAE. Los ratones fueron monitoreados

## 10. AISLAMIENTO CELULAR DEL SNC

---

diariamente desde el día 8 después de la inducción de EAE. Se les asignaba un valor según las manifestaciones clínicas de la EAE que presentarían. Los ratones se asignaron aleatoriamente a los grupos de tratamiento y se puntuaron ciegos al genotipo. Los valores clínicos de EAE se definieron de la siguiente manera (Figura II.7.):

- 0: sin signos.
- 1: cola completamente flácida.
- 1,5: escasa capacidad de incorporarse tras voltearlos (*flipping*).
- 2: debilidad de las extremidades posteriores.
- 3: parálisis de las extremidades posteriores.
- 4: parálisis de las extremidades anteriores.
- 5: moribundo.

### 10. Aislamiento celular del SNC

Los ratones se perfundieron a través del corazón usando PBS1X enfriado con hielo. El cerebro y la médula espinal se extrajeron y picaron con ayuda de una hoja de bisturí. Al homogeneado tisular se añadió una solución de HBSS que contenía 0,66 mg/mL de papaína (Sigma-Aldrich, ref. P4762) durante 20 min y luego se incubó otros 20 min con el mismo volumen de DMEM suplementado con colagenasa D (Roche, ref. 11088858001) y DNasa I (Thermo Fisher Scientific, ref. 90083) a unas concentraciones de 0,66 mg/ml y 8 U/ml, respectivamente. Las muestras se agitaron a 80 rpm a 37 °C. Tras las incubaciones anteriores, el tejido se disoció mecánicamente usando una pipeta serológica de 15 ml y se filtró a través de un filtro de células de 70  $\mu\text{m}$  (Fisher Scientific) en un Falcon de 50 ml. La suspensión celular se centrifugó a 500 G durante 5 min. El *pellet* se resuspendió en 10 ml de solución de Percoll al 30% (9 ml de Percoll (GE Healthcare Biosciences, ref. 17-5445-01), 3 ml de PBS 10X y 18 ml de ddH<sub>2</sub>O)

## **11. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS ESPLÉNICAS**

---

y se añadió 5 ml de PBS1X evitando que se mezclen las fases. La suspensión de Percoll se centrifugó a 500 G durante 25 min sin freno a 4° C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se lavó con PBS1X, se centrifugó a 500 G durante 5 min y se preparó para aplicaciones posteriores.

### **11. Aislamiento y cultivo de células esplénicas**

Los bazos se extrajeron de los ratones y se mantuvieron en PBS1X frío para lavar el órgano de restos de sangre o grasa. A continuación, en el entorno estéril de la campana de flujo laminar se disgregaron con ayuda del émbolo de una jeringa a través de un filtro de 70  $\mu\text{m}$  y paulatinamente se fue añadiendo MACS buffer (PBS1X-BSA 0.5 % (p:vol)- EDTA 2 mM pH 8.0) hasta alcanzar 50 ml. La suspensión celular se centrifugó a 1600 rpm durante 5 min a 4° C. Se descartó el sobrenadante y, el precipitado se resuspendió y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente en 1 ml de *ACK Lysis Buffer* (Gibco) para lisar los glóbulos rojos. Se volvió a añadir *MACS buffer* hasta completar 50 ml y se centrifugó como se ha indicado anteriormente. Las CD CD11c+, las células T vírgenes CD4+ o activadas CD45+ se obtuvieron de esta suspensión celular mediante perlas magnéticas (Miltenyi: 130-125-835, 130-104-453 y 130-052-301 respectivamente). Las CD se maduraron y activaron con LPS durante 24 h. En primer lugar, cuando se llevaron a cabo cocultivos, las CD se activaron durante 6 h y posteriormente, se lavaron e incubaron con las células T durante 48 h.

### **12. Tratamientos celulares**

Los reactivos químicos empleados en los tratamientos se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante y se mantuvieron a -20°C en oscuridad extremando esta precaución para los que son fotosensibles. En las condiciones control, los cultivos se incubaron con los mismos volúmenes de solvente. El solvente empleado para disolver estos compuestos fue DMSO (Dimetilsulfóxido).

- CH223191 (Sigma Aldrich): antagonista de AHR y utilizado a una concen-

## 13. ENSAYOS *IN VITRO* DE SOBREENPRESIÓN

---

tración 10  $\mu\text{M}$  durante los tiempos indicados.

- FICZ (6-Formylindolo(3,2-b)carbazole) (Tocris Bioscience): agonista de AHR y utilizado a una concentración 0.5  $\mu\text{M}$  durante los tiempos indicados.
- IAA (3-Indoleacetic acid) (Sigma Aldrich): agonista endógeno de AHR considerado producto de la microbiota y utilizado a una concentración 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  durante los tiempos indicados.
- I3S (indoxyl 3-sulfate) (Sigma Aldrich): agonista endógeno de AHR considerado producto de la microbiota y utilizado a una concentración 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  durante los tiempos indicados.
- TA (triptamine) (Sigma Aldrich): agonista endógeno de AHR considerado producto de la microbiota y utilizado a una concentración 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  durante los tiempos indicados.
- LPS (lipopolysaccharide) (E.coli 0111:B4, InvivoGen, ref. tlr1-3pelps): maduración y activación de CD y utilizado a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  durante los tiempos indicados.
- MOG35-55 (myelin oligodendrocyte glycoprotein) (Genemed Synthesis, ref. 110582): activación CD y utilizado a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  durante los tiempos indicados
- DHA (docosahexaenoic acid) (Sigma Aldrich): ácido graso omega-3 poliinsaturado y utilizado a las concentraciones de 5, 10 ó 50  $\mu\text{M}$  durante los tiempos indicados.

## 13. Ensayos *in vitro* de sobreexpresión

### 13.1. Vectores de expresión

Los plásmidos empleados fueron los siguientes:

- pEntpd1-Luc: construcción plasmídica que contiene el promotor del gen *Entpd1* seguido del gen de la luciferasa de *Gaussia* (GeneCopoeia).

## 13. ENSAYOS *IN VITRO* DE SOBREEXPRESIÓN

---

- pAHR: plásmido que contiene la región promotora de AHR (Addgene).
- pGud-Luc: construcción plasmídica disponible en el laboratorio del Dr. Francisco J. Quintana. Este plásmido porta el gen de la luciferasa de luciérnaga (*firefly luciferase*) bajo el control de un promotor sensible a la activación de AHR, ya que contiene el promotor de su diana transcripcional *Cyp1a1* y cuatro sitios específicos de unión al DNA o DRE (*Dioxin Response Element*) [676].
- pTK-Renilla: plásmido que contiene el promotor de la luciferasa de Renilla bajo el control del promotor de la timidina quinasa constitutivamente activo (Promega, Madison, WI).

### 13.2. Transformación de células competentes y midipreparación

Con el objetivo de conservar y no agotar la disponibilidad de los plásmidos y poder reproducir los experimentos, se transformaron en células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  (New England Biolabs) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Después se sembraron en placas LB (Lysogeny Broth)-Agar con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina (Thermo Fisher) y mantuvieron a 37° C durante toda la noche. Al día siguiente se picó una colonia aislada y se creció en 50 mL de LB con 100  $\mu$ g/ml ampicilina hasta el día siguiente. Por último, se purificó el DNA plasmídico mediante el *kit Genopure Plasmid Midi* (Roche Life Science).

### 13.3. Transfección transiente

El día previo a la transfección las células HEK293 se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con FBS (fetal bovine serum) al 10 % en placas de 96 pocillos a una densidad de 15000 células/pocillo. Al día siguiente las células se transfectaron con el reactivo Lipofectamine 2000 (11668019, Thermo Fisher Scientific) en medio sin suero OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium, (Life Technologies). En las instrucciones del fabricante se indicaba no superar la transfección de 100 ng de DNA plasmídico en placas

de 96 pocillos para evitar afectar a la viabilidad celular. Como los experimentos requerían la transfección conjunta de dos construcciones nunca se transfectaron más de 50 ng de ninguna de ellas para evitar sobrepasar este límite. La transfección de los vectores se mantuvo durante la noche o como máximo 24 h antes de la realización de los experimentos. En ese momento se cambió el medio y se añadió medio fresco DMEN completo con el tratamiento correspondiente a cada experimento.

### 14. Actividad de la luciferasa

La actividad de las luciferasas se midió siguiendo las instrucciones de los fabricantes en *GloMax Explorer Multimode Microplate Reader* (Promega). En la transfección conjunta de los plásmidos pGud-Luc y pTK-Renilla, la actividad de la luciferasa Renilla se analizó utilizando el sistema *Dual Luciferase Reporter System* (Promega) y se normalizó a la actividad de la luciferasa de Renilla. En el otro caso de transfección conjunta de los plásmidos pEntpd1-Luc y pAHR, la actividad de luciferasa Gaussia se evaluó con *Gaussia Luciferase Flash Assay Kit* (16159, Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 15. Análisis de niveles proteicos mediante *Western-blot*

#### 15.1. Preparación de extractos proteicos

##### 15.1.1. Extracción de proteína total

Se extrajo un fragmento de 50 mg de tejido del lóbulo izquierdo del hígado de ratón. Se realizó un primer lavado con PBS a 4°C para eliminar los eritrocitos y el tejido se resuspendió en tampón de extracción de proteínas TNE (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, Nonidet P-40 al 1% (v/v), EDTA 20 mM) suplementado con PMSF 1 mM y 4 µg/µl del inhibidor de proteasas Complete (Roche). Posteriormente, se procedió a homogeneizar el tejido con un homogeneizador tissue master (OM-

## 15. ANÁLISIS DE NIVELES PROTEICOS MEDIANTE *WESTERN-BLOT*

---

NI). El homogeneizado resultante se incubó durante 1-2 h a 4°C con agitación continua en un rotador para facilitar la lisis de la suspensión celular. A continuación, se centrifugó durante 15 min a 15000 G recogiendo el sobrenadante y conservándose a -80°C hasta su uso.

### 15.1.2. Extracción de la fracción proteica nuclear y citoplasmática

Inicialmente se procesó el tejido como se expuso en el apartado anterior. Se disgregó el tejido en 150  $\mu$ l de tampón A (PBS conteniendo DTT 0,5 mM, PMSF 0,2 mM, Nonidet P-40 0,05% y 4  $\mu$ g/ $\mu$ l de inhibidores de proteasas Complete (Roche)) durante 10 min a 4°C y se centrifugaron en las mismas condiciones anteriores. El sobrenadante obtenido fue centrifugado de nuevo y la fracción no precipitada fue conservada como la fracción proteica citoplasmática. El precipitado de esta última centrifugación fue resuspendido en tampón A y centrifugado dos ciclos más para eliminar en todo lo posible la contaminación de restos proteicos citoplasmáticos. Tras ello, el último precipitado se resuspendió en tampón B (PBS conteniendo NaCl 150 mM, DTT 0,5mM, PMSF 0,2 mM EDTA, glicerol al 25% y 4  $\mu$ g/ $\mu$ l de inhibidores de proteasas Complete (Roche)) durante 30 min a 4°C. Las muestras se sometieron a ciclos de 30 s de sonicación interrumpidos por 2 min de incubación en hielo hasta la disolución total de la proteína precipitada. Por último, se realizó una centrifugación a 14000 g durante 30 min a 4°C y se recogió el sobrenadante, considerándolo como la fracción proteica nuclear. La pureza del contenido proteico de cada fracción se analizó por immunoblotting utilizando la Histona H3 (Cell Signaling) como control de fracción nuclear y Gapdh (Cell Signaling) como control de la fracción citoplasmática.

## 15.2. Medida de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de los extractos celulares se determinó por el método colorimétrico de Bradford utilizando el reactivo *Coomassie plus protein assay reagent* (Pierce) y albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Para ello, se tomaron cantidades crecientes de BSA (entre 0,5 y 3,0  $\mu$ g) que se diluyeron en agua hasta un volumen final de 200  $\mu$ l. Las muestras se prepararon en una



## 15. ANÁLISIS DE NIVELES PROTEICOS MEDIANTE *WESTERN-BLOT*

---

placa de 96 pocillos, añadiendo 1  $\mu\text{l}$  de extracto proteico en 119  $\mu\text{l}$  de agua. Tanto en las muestras como en la recta patrón, se añadieron 80  $\mu\text{l}$  de reactivo de Coomassie, se homogenizó y se midió la absorbancia a 595 nm en el lector multiplaca *plate reader AF2200*. La concentración de proteína de cada uno de los extractos se determinó por regresión lineal a partir de la recta patrón construida con las concentraciones conocidas de BSA.

### 15.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y transferencia a membranas de nitrocelulosa

Para la realización de electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) se utilizó el sistema de tampón discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Se tomó un total de 25  $\mu\text{g}$  de extracto proteico y se añadió el volumen adecuado de tampón de carga para proteínas que contenía Tris-HCl 62,2 mM pH 6.8, SDS al 10 % (p/v), glicerol al 50 % (v/v), azul de bromofenol al 0,025 % (p/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol al 20 % (v/v). Las proteínas se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min. Se separaron en función de su peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida (Bio-Rad) en condiciones desnaturalizantes empleando un tampón que contenía Tris 25 mM, glicina 190 mM y SDS al 0,1 % (p/v). Las concentraciones de poliacrilamida empleadas oscilaron entre el 7 % y 12 %, en función del peso molecular de las proteínas analizadas.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) por aplicación de un campo eléctrico en una cubeta con tampón de transferencia que contenía Tris 25 mM, glicina 190 mM y metanol al 20 % (v/v). La transferencia se realizó a 4°C aplicando una intensidad de campo eléctrico de 1000 mA en total en el período de 3-4 h. Las membranas se tiñeron con el colorante reversible *Ponceau* (Sigma-Aldrich) con el fin de comprobar la eficacia de la transferencia y la homogeneidad de carga para las diferentes muestras. Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 2 h a temperatura ambiente en tampón TBS-T que contenía Tris-HCl 50

## 15. ANÁLISIS DE NIVELES PROTEICOS MEDIANTE *WESTERN-BLOT*

---

Tabla M.3: Anticuerpos empleados en el protocolo de *Western Blot*.

Proteína (Casa comercial)	Concentración
Ahr (Enzo)	1:1000
Ciclina D1 (Santa Cruz Biotechnology)	1:200
p21 (Santa Cruz Biotechnology)	1:200
p53 (Cell Signaling)	1:1000
PCNA (Santa Cruz Biotechnology)	1:200
pRB (Cell Signaling)	1:1000
RB (Cell Signaling)	1:1000
P65 (Cell Signaling)	1:1000
Oct4 (Santa Cruz Biotechnology)	1:200
Sox2 (Santa Cruz Biotechnology)	1:200
Nanog (Novus)	1:1000
pYap (Novus)	1:1000
Yap (Novus)	1:1000
Taz (Novus)	1:1000
$\beta$ -Catenina (BD Biosciences)	1:1000
Gapdh (Cell Signaling)	1:1000
Histona H3 (Cell Signaling)	1:1000
pAKT (Cell Signaling) 1:1000	1:200
AKT (Cell Signaling)	1:1000

mM pH 7,5, NaCl 75 mM y Tween-20 al 0,2% (v/v) y al que se añadió leche desnatada al 5% (p/v). Las membranas se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente empleando la dilución y las condiciones indicadas en la **Tabla 3**.

Tras 5 lavados de 10 min en TBS-T, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase*, HRP). A continuación, las membranas se sometieron a 5 lavados de 10 min cada uno en TBS-T y a un lavado final de 5 min en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 75 mM)

## 16. TINCIÓN DE SECCIONES CON HEMATOXILINA Y EOSINA

---

eliminando el detergente para evitar interferencias en el revelado. Finalmente, se añadió el sustrato quimioluminiscente SuperSignal Chemiluminescent Substrate (Pierce) durante 5 min a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron utilizando un equipo Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad). Como control interno para normalizar los niveles de proteína, se utilizó la tinción de la membrana con el colorante *Ponceau*. La cuantificación de los niveles de expresión por densitometría se realizó con el programa de análisis y procesamiento de imágenes ImageJ.

### 16. Tinción de secciones con hematoxilina y eosina

Una vez desparafinadas e hidratadas, las secciones de 3-5  $\mu\text{m}$ , se incubaron en una solución de hematoxilina de Harris durante 10 min. Tras esto se lavaron con agua hasta conseguir que el color de la hematoxilina virara hasta azul violáceo (al menos 20 min en agua templada). Después, se incubaron con una solución de eosina durante 30 s y se lavaron para eliminar el exceso de este reactivo. Tras un paso de deshidratación, las secciones se montaron empleando el medio DPX (Sigma-Aldrich) y se observaron y fotografiaron en un microscopio Olympus BX51.

### 17. Inmunofluorescencia de tejidos

Las secciones de tejidos hepáticos, previamente fijadas e incluidas en parafina, se desparafinaron en xilol, deshidrataron en etanol y rehidrataron gradualmente con PBS. Una vez hidratadas, se realizó un desenmascaramiento con un tampón citrato pH 6,0. Tras lavar con PBS-Tritón (0,05 % v/v), se llevó a cabo el bloqueo de los epítomos inespecíficos con la solución de bloqueo PBS-Tritón (0,05 % v/v), gelatina 0,2 % (p/v) y BSA (2 % p/v). A continuación, las secciones se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario PCNA (Santa Cruz) diluido en solución de bloqueo (1:200). Concluida la incubación, las secciones se lavaron

## 18. ANÁLISIS DE CITOQUINAS MEDIANTE ELISA

---

tres veces con PBS-T-G durante 10 min y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con los fluorocromos Alexa-633. Tras lavar nuevamente con PBS-T-G, las secciones se incubaron con Hoestch 33342 diluido 1:1000 en PBS durante 5 min, se lavaron con PBS para eliminar el exceso de sonda y se montaron con cubreobjetos utilizando una solución de glicerol-PBS1X (1:2). La visualización de las secciones se realizó en un microscopio confocal Olympus FV1000 en la unidad de microscopía del Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura. Las imágenes fueron analizadas empleando el software FV10 (Olympus).

### 18. Análisis de citoquinas mediante ELISA

La concentración de IL6 y TNF $\alpha$  se determinó a partir del suero de ratones hepatectomizados. El plasma sanguíneo se obtuvo como se ha indicado en el apartado anterior y se diluyó en la proporción indicada por el fabricante del kit ELISA. Se determinaron la cantidad de IL6 (RayBiotech) y de TNF $\alpha$  (Cloud-Clone) siguiendo el protocolo como se indicaba. Se utilizaron 3 ratones de cada genotipo por cada una de las condiciones estudiadas. La concentración de IL10, IL17A, GM-CSF e IFN $\gamma$  se determinó a partir de sobrenadantes de cocultivos de DC y células T CD4+ para cuantificar la liberación de citoquinas mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las placas Costar de 96 pocillos (Corning, ref. 3690) se recubrieron con anticuerpos de captura diluidos en PBS1X: captura de GM-CSF anti-ratón (Invitrogen, ref. 88-7334-88, 1:250), IL-anti-ratón 10 (Invitrogen, ref. 88-7105-88, 1:250), IFN- $\gamma$  anti-ratón purificado (BD Biosciences, ref. 551309, 1:500) y IL-17A anti-ratón purificado (BD Biosciences, ref. 555068, 1:500) durante la noche a 4° C.

Al día siguiente, las placas se lavaron 2 veces con PBS-Tween al 0,05% (Boston BioProducts, ref. IBB-171X) y se bloquearon con PBS1X- BSA al 1% (Thermo Fisher Scientific, ref. 37525) durante 2 h a temperatura ambiente. La curva estándar se preparó a partir de estándares de citoquinas diluidos en diluyente Elispot 1X (eBioscience, ref. 00-4202-56). Las muestras se diluyeron 4X para IFN- $\gamma$ , 2X para GM-CSF e IL-17A en diluyente Elispot y se sembraron sin diluir

## 19. ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO O FACS.

---

para IL-10. Las placas se lavaron 2 veces con PBS1X-Tween al 0,05 %. Se añadieron las muestras y el volumen de las citoquinas a concentración conocida para construir la curva estándar. Por último, se incubaron durante la noche a 4°C. El tercer día, las placas se lavaron 5X con PBS1X-Tween al 0,05 % y se incubaron con anticuerpos de detección diluidos en diluyente Elispot 1X: Detección de GM-CSF anti-ratón (Invitrogen, ref. 88-7334-88, 1:250), anti- detección de IL-10 de ratón (Invitrogen, ref. 88-7105-88, 1:250), biotina anti-IFN- $\gamma$  de ratón (BD Biosciences, ref. 554410, 1:500) y biotina anti-ratón IL-17A (BD Biosciences, ref. 555067, 1:500) agitado durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavaron 8 veces con Tween al 0,05 % en PBS 1X y se incubaron con Avidin-HRP diluido en diluyente Elispot 1X (Invitrogen, ref. 88-7334-88, 1:250) y se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron 8 veces con PBS1X-Tween al 0,05 % y se revelaron usando una solución de sustrato TMB 1X (Invitrogen, ref. 00-4201-56). Por último, la reacción se detuvo con *KPL TBM Stop Solution* (SeraCare, ref. 5150-0021) y las placas se leyeron a 450 nm en *GloMax Explorer Multimode Microplate Reader* (Promega).

## 19. Análisis de citometría de flujo o FACS.

### 19.1. Análisis de DC

Se incubaron suspensiones de células del SNC con anticuerpos de superficie y un marcador de células vivas/muertas en hielo. Después de 30 min, las células se lavaron con BSA al 0,5 %, EDTA 2 mM en PBS1X y se fijaron de acuerdo con el protocolo del fabricante (eBiosciences, ref. 00-5523-00). La tinción intracelular se realizó durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos de superficie usados en este estudio fueron: BUV395 anti-ratón MHC-II (Invitrogen, ref. 17-5321-82, 1:200); BUV496 anti-ratón CD24 (BD Biosciences, ref. 564664, 1:100); BUV563 anti-ratón Ly-6G (BD Biosciences, ref. 612921, 1:100); BUV661 anti-ratón CD45 (BioLegend, ref. 103147, 1:100); BV570 anti-ratón Ly-6C (BioLegend, ref. 128030, 1:100); BV605 anti-ratón CD80 (BD Biosciences, ref. 563052, 1:100); BV650 anti-ratón CD3 (BioLegend, ref. 100229, 1:100); BV711 anti-ratón CD8a (BioLegend,

## 19. ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO O FACS.

---

ref. 100748, 1:100); BV786 anti-ratón CD11b (BioLegend, ref. 101243, 1:100); PE-Texas Red anti-CD11c de ratón (BioLegend, ref. 117348, 1:100); PeCy7 anti-CD4 de ratón (BioLegend, ref. 100422, 1:100); APC anti-ratón/humano CD45R/B220 (BioLegend, ref. 103212, 1:100); APC-R700 anti-ratón CD103 (BD Biosciences, ref. 565529, 1:100); APC/Cy7 anti-ratón F4/80 (BioLegend, ref. 123118, 1:100). Las células se procesaron en un Symphony A5 (BD Biosciences) y los datos se analizaron en Flowjo 10 (Becton Dickinson).

### 19.2. Análisis de células T

Para analizar los subconjuntos de células T del SNC y teñir sus citoquinas intracelulares, la suspensión celular se estimuló con 50 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich, ref. P8139), ionomicina 1  $\mu$ M (Sigma-Aldrich, ref. I3909 -1ML), GolgiStop (BD Biosciences, ref. 554724, 1:1500) y GolgiPlug (BD Biosciences, ref. 555029, 1:1500) diluidos en RPMI (Life Technologies, ref. 11875119) que contienen 10 % de FBS, 1 % de penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol 50  $\mu$ M (Sigma-Aldrich, ref. M6250) y 1 % de aminoácidos no esenciales (Life Technologies, ref. 11140050). Después de 4 h, las suspensiones celulares se lavaron con BSA al 0,5 %, EDTA 2 mM en PBS1X y se incubaron con anticuerpos de superficie y un marcador de células vivas/muertas en hielo. Después de 30 min, las células se lavaron con BSA al 0,5 %, EDTA 2 mM en PBS 1X y se fijaron de acuerdo con el protocolo del fabricante de un kit de fijación intracelular (eBiosciences, ref. 00-5523-00).

Los anticuerpos de superficie usados en este estudio fueron: BUV661 anti-ratón CD45 (BioLegend, ref. 103147, 1:100); PeCy7 anti-CD4 de ratón (BioLegend, ref. 100422, 1:100); Alexa fluor 647 anti-ratón CD25 (BioLegend, ref. 109311, 1:100); BV750 anti-ratón CD3 (BioLegend, ref. 100249, 1:100); BUV395 anti-ratón CD69 (BD Biosciences, ref. 740220, 1:100); BUV737 anti-ratón CD11b (BD Biosciences, ref. 564443, 1:100); BV805 anti-ratón CD8a (BD Biosciences, ref. 612898, 1:100); PE/Cy5 anti-CD44 de ratón (BioLegend, ref. 103010, 1:100). Los anticuerpos intracelulares fueron: BV421 anti-GM-CSF de ratón (BD Biosciences, ref. 564747, 1:100); PE-CF594 anti-ratón IL-10 (BioLegend, ref.

505034, 1:100); Alexa Fluor 700 anti-ratón Ki-67 (BioLegend, ref. 652420, 1:100); APC/Cy7 anti-IFN- $\gamma$  de ratón (BD Biosciences, ref. 561479, 1:100); Alexa Fluor 488 anti-ratón FoxP3 (eBioscience, ref. 11-5773-82, 1:100); PE anti-ratón IL-17A (BioLegend, ref. 506904, 1:100). Las células se procesaron en un Symphony A5 (BD Biosciences) y los datos se analizaron en Flowjo 10 (Becton Dickinson).

### 19.3. DC aisladas de un ratón P65 *reporter*

Las DC esplénicas aisladas de ratones P65 *reporter* (FVB.Cg-Tg (HIV-EGFP, luc) 8Tsb/J) usando perlas magnéticas (130-125-835, Miltenyi) se estimularon durante 1 h con los tratamientos indicados (ligandos agonistas y antagonistas de AHR). La fluorescencia se determinó por citometría de flujo en un Symphony A5 (BD Biosciences) y los datos se analizaron en Flowjo 10 (Becton Dickinson).

## 20. Análisis de la expresión génica

### 20.1. Extracción de RNA

#### 20.1.1. Extracción del RNA total a partir de tejidos

El tejido se disgregó utilizando el homogeneizador *tissue master* (OMNI) en 1 ml de Trizol (Invitrogen). El homogeneizado resultante se dejó reposar en Trizol durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 0,5 ml de cloroformo y se vorteo vigorosamente durante 15 s. Tras 2-3 min a temperatura ambiente se centrifugó a 12.000 G durante 15 min a 4°C. Tras la centrifugación, se pudieron observar dos fases en el tubo, transfiriéndose la fase acuosa superior a un tubo limpio evitando arrastrar contaminantes de la fase orgánica inferior. Seguidamente se añadieron a la solución acuosa 500  $\mu$ l de isopropanol y se agitó en un vórtex. A continuación, se centrifugó a 12.000 G durante 10 min a 4°C. Tras la centrifugación, el sobrenadante se eliminó y el RNA precipitado se lavó con etanol al 80%, y se centrifugó de nuevo a 7.500G durante 5 min a 4°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el RNA se dejó secar a temperatura ambiente durante 2-3 min en un termobloque a 70°C con el fin de conseguir la

## 20. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

---

total evaporación del alcohol. El precipitado obtenido se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua DEPC (*diethyl pyrocarbonate*) y se hidrató en un termobloque a 50°C durante 5-10 min.

Para eliminar la contaminación de DNA genómico de la muestra y limpiar posibles restos salinos, se utilizó el kit comercial *High Pure RNA isolation* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado, se determinó la concentración del RNA de la muestra midiendo en un NanoDrop (Eppendorf BioPhotometer) la absorción espectrofotométrica a 260 nm y la presencia de proteínas contaminantes estableciendo la relación A260nm/A280nm.

### 20.1.2. Extracción del RNA total a partir de cultivos celulares

La obtención de RNA total a partir de cultivos celulares se realizó empleando el kit *High Pure RNA isolation* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado, se determinó su concentración como se mencionó anteriormente.

### 20.1.3. Extracción del RNA total a partir de muestras limitadas

La obtención de RNA total a partir de muestras muy limitadas se realizó empleando el kit comercial *PicoPure RNA Isolation Kit* (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado el RNA, se determinó su concentración como se mencionó anteriormente.

## 20.2. Transcripción reversa

Se transcribieron de forma reversa (*Reverse Transcription*, RT) entre 200 ng y 1  $\mu$ g de RNA total empleando el kit *iScript Reverse Transcription* (Bio-Rad). Este kit contiene random primers que hibridan con cualquier secuencia aleatoria de 6 nucleótidos presentes en el RNA celular. El fabricante indica que, tras mezclar los diferentes componentes de la reacción, hay que llevar a cabo en un termociclador el siguiente protocolo: 5 min a 25° C (*priming*), 20 min a 46° C (transcripción reversa) y 1 min a 95° C (inactivación de la retrotranscriptasa).



### 20.3. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR

Para los ensayos de qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*), la reacción se llevó a cabo utilizando el kit *SYBR Select Master MIX* (Life Technologies) o TaqMan™ Universal PCR Master Mixes (Applied Biosystems) en un termociclador de PCR a tiempo real ViiA™ 7 o StepOne (Applied Biosystems). El protocolo constaba de una primera etapa de desnaturalización a 95°C durante 10 min seguida de una repetición de un máximo de 50 ciclos en cada uno de los cuales se realizaron los tres pasos siguientes: desnaturalización del DNA a 95°C durante 30 s, hibridación de los cebadores al DNA molde durante 30 s a una temperatura específica para cada producto de PCR y extensión de la cadena naciente a 72° C durante 30 s. Se realizaron curvas de fusión al final de cada reacción para confirmar la amplificación de un único producto de PCR. Para ello, se midió la emisión de fluorescencia de sonda durante el cambio paulatino de temperatura de 60°C a 95°C a razón de 0,5°C/ciclo. La secuencia de los oligonucleótidos cebadores que se utilizaron para qPCR se detallan en la **Tabla 4** y **Tabla 5**.

La amplificación del gen *Gapdh* se usó como control interno para normalizar la expresión de los genes objeto de estudio ( $\delta Ct$ ). Como control negativo se realizaron reacciones de PCR en las que no se añadió cDNA molde. La expresión de cada gen o de cada transcrito se calculó refiriendo los valores obtenidos en presencia de tratamiento a los correspondientes a la situación basal o de no tratamiento ( $2^{-\delta\delta Ct}$ ).

## 21. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Con el fin de determinar la unión de una proteína a una región de DNA *in vivo*, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (*Chromatin Immunoprecipitation*, ChIP). En primer lugar, con el objetivo de estabilizar las uniones de las proteínas al DNA, se añadió formaldehído al 1% durante 15 min a temperatura ambiente con agitación suave. La reacción de entrecruzamiento proteína-DNA se detuvo añadiendo glicina 0.125 M durante 5 min. A continuación, el tejido se lavó dos veces con PBS frío, se homogeneizó y las suspensiones

## 21. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP)

Tabla M.4: Anticuerpos empleados en el protocolo de *Western Blot*.

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Ahr</i>	AGCCGGTGCAGAAAACAGT	AGGCGGTCTAACTCTGTGT
<i>Axin2</i>	ACTGGGTCGCTTCTCTTGAA	CTCCCCACCTTGAATGAAGA
<i>Ccnd1</i>	CACAACTTCTCGGCAGTCAA	AGTGCGTGCAGAAGGAGATT
<i>CD36</i>	TCCAGCCAATGCCTTTGC	TGGAGATTACTTTTTTCAGTGCAGAA
<i>c-Jun</i>	TGAGTTGGCACCCACTGTTA	TCCCCTATCGACATGGAGTC
<i>c-Myc</i>	CCTGACGACGAGACCTTCA	TGGTAGGAGGCCAGCTTCT
<i>Cyp11a1</i>	ACAGACAGCCTCATTGAGCA	GGCTCCACGAGATAGCAGTT
<i>FAE</i>	TGACTATGAACTATGGCGTGCAT	CCGGGAGACTCGGAAACC
<i>Gapdh</i>	TGAAGCAGGCATCTGAGGG	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG
<i>Gck</i>	ATGGCTGTGGATACTACAAGGA	TTCAGGCCACGGTCCATCT
<i>Il6</i>	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TCCACGATTTCCCAGAGAAC
<i>Klf4</i>	TTTCTCGCCTGTGTGAGTTC	CACAAGTCCCCTCTCTCCAT
<i>Lats1</i>	GACCCAGCTAATGGACAAA	GTTTGCAGTCCAGGGACATT
<i>Lats2</i>	GTGTCCACAAGATGGGCTTT	CTCCATGCTGTCTGTCTCA
<i>Nanog</i>	AAGTACCTCAGCCTCCAGCA	GTGCTGAGCCCTTCTGAATC
<i>Oct4</i>	CACGAGTGGAAAGCAACTCA	TTCATGTCCTGGGACTCCTC
<i>Pdk2</i>	AGGGGCACCCAAGTACATC	TGCCGGAGGAAAGTGAATGAC
<i>PPARα</i>	GATTGAGAAGAAGAACCGGAACA	TGCTTTTTTTCAGATCTTGGCATTTC
<i>PPARβ</i>	CCCAATGGTTGCTGATTACAAA	GAGGGAGTTAGAAGGTTCTTCATGA
<i>PXR</i>	CAGTTGCTGCGCATCCAA	TGCTGCTAAATAACTCTTGCATGAG
<i>Slc2a2</i>	TCAGAAGACAAGATCACCGGA	GCTGGTGTGACTGTAAGTGGG
<i>Slc2a4</i>	ATGACCAAGCCCTGAATCTG	CGTAGGATGTGGTGTATGACG
<i>Sox2</i>	TGCGAGCGCTGCACAT	TCATGAGCGTCTTGGTTTTCC
<i>Stat3</i>	TTCTGCACGTACTCCATTGC	CAAAACCCCTCAAGAGCCAAG
<i>Tnfa</i>	CCACCACGCTTCTGTCTA	CTCCACTTGGTGGTTTTGCTA
<i>Yap</i>	AGGAGAGACTGCGGTTGAAA	GAGGGATGCTGTAGCTGCTC

celulares se resuspendieron e incubaron durante 10 min a 4° C en tampón de lisis-SDS conteniendo inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Los lisados celulares fueron sonicados durante 20-30 min en un equipo Bioruptor (Diageno-de) a máxima potencia con ciclos de 0,5 min de sonicación/reposo. Los fragmentos de DNA obtenidos (200-1000 pb) se centrifugaron a 4° C durante 10 min a 13000 G. Se midió la concentración de DNA del sobrenadante (al menos 100-150 µg de cromatina por IP) y éste se diluyó diez veces en tampón de dilución de ChIP

## 21. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP)

Tabla M.5: Referencias de los *primers* usados con la sonda TaqMan.

Gen	Referencia (Thermo Fisher)
<i>Ahr</i>	Mm00478932 <sub>m1</sub>
<i>Csf2</i>	Mm01290062 <sub>m1</sub>
<i>Cyp1a1</i>	Mm00487218 <sub>m1</sub>
<i>Cyp1b1</i>	Mm00487229 <sub>m1</sub>
<i>Fads3</i>	Mm01200850 <sub>m1</sub>
<i>Foxp3</i>	Mm00475162 <sub>m1</sub>
<i>Gapdh</i>	Mm99999915 <sub>g1</sub>
<i>Ifng</i>	Mm00801778 <sub>m1</sub>
<i>Il1b</i>	Mm00434228 <sub>m1</sub>
<i>Il6</i>	Mm00446190 <sub>m1</sub>
<i>Il10</i>	Mm00439614 <sub>m1</sub>
<i>Il12</i>	Mm00439618 <sub>m1</sub>
<i>Il17</i>	Mm00439618 <sub>m1</sub>
<i>Il23</i>	Mm00518984 <sub>m1</sub>
<i>Il27</i>	Mm00461162 <sub>m1</sub>
<i>Nos2</i>	Mm00440502 <sub>m1</sub>
<i>Tgfb1</i>	Mm01178820 <sub>m1</sub>
<i>Tnf</i>	Mm00443258 <sub>m1</sub>

conteniendo inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Para reducir las uniones inespecíficas, las muestras se incubaron durante 45 min a 4° C con agitación suave en presencia de proteína A/G Plus agarosa. Tras centrifugar durante 5 min a 200 G, se añadió a los sobrenadantes el anticuerpo específico frente a la proteína de interés (2-3  $\mu\text{g}$ ) y se incubó durante toda la noche a 4° C con rotación suave. Como control negativo se realizaron incubaciones en ausencia de anticuerpo primario, y como control positivo se utilizaron alícuotas de los extractos previos a su incubación con el anticuerpo primario (DNA total o *input*). Al día siguiente tras añadir una nueva alícuota de A/G Plus agarosa, se realizó una incubación adicional de 1 h a 4° C con agitación suave. Las muestras se centrifugaron a 2000

## 21. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP)

---

**Tabla M.6:** *Primers* empleados para el análisis de secuencias de DNA obtenidas tras la inmunoprecipitación de cromatina.

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
AKT	CACTGCGCACACCAACAG	CGGAGTAGGAGCAGGAAGTG
Il1	GCATCTCAAAGGTGACACGG	CGAGTCTCTGCAGGTTCACT
Il6	AGCCTCTTATTCATGTGTGTGTG	ACTTGAGCATGTCTTGATGGG
Tnf $\alpha$	CCAGACACTCACCTCATCCC	TGGAAGTGGCAGAAGAGGC

G durante 1 min a 4° C. Los precipitados conteniendo los complejos anticuerpo-proteína-DNA se lavaron durante 5 min con los siguientes tampones: tampón de lavado de baja fuerza iónica (SDS 0,1 %, Triton X-100 1 %, EDTA 2 mM, Tris-HCl 120 mM pH 8, NaCl 150 mM), tampón de lavado de alta fuerza iónica (SDS 0,1 %, Triton X-100 1 %, EDTA 2 mM, Tris-HCl 120 mM pH 8, NaCl 500 mM), tampón de lavado conteniendo LiCl (LiCl 0,25 M, NP40 1 %, deoxicolato 1 %, EDTA 1 mM, Tris-HCl pH 10 mM 8.1) y tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM). Finalizados estos lavados, los complejos se extrajeron con tampón de elución (SDS 1 %, NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, 200  $\mu$ l por condición) durante 15 min con agitación, tras lo cual fueron centrifugados a 2000 G durante 1 min. El proceso de extracción se repitió una vez más y todos los eluidos se combinaron en un mismo tubo. Posteriormente, se incubaron durante 4 h a 65° C en NaCl 200 mM para romper los entrecruzamientos DNA-proteína y liberar el DNA, incorporándose en este paso los DNA *input*. Con el fin de eliminar las proteínas, las muestras se incubaron durante 1 h a 45°C en una solución conteniendo EDTA 10 mM, Tris HCl 40 mM pH 6.5 y 40  $\mu$ g/ml de Proteinase K (Roche). Finalmente, el DNA inmunoprecipitado se purificó usando columnas *ChIP DNA Clean and Concentrator* (Zymo Research) diseñadas para la purificación de muestras conteniendo SDS. La cuantificación de la unión proteína-DNA se hizo mediante PCR en tiempo real empleando un equipo StepOne (Applied Biosystems) usando cebadores específicos para cada región promotora analizada (**Tabla 6**). Los resultados se muestran como porcentaje respecto al input de DNA de la inmunoprecipitación menos el porcentaje respecto al input de DNA del control sin anticuerpo.

## **22. Probióticos sintéticos**

### **22.1. Producción de EcN y EcnIAA**

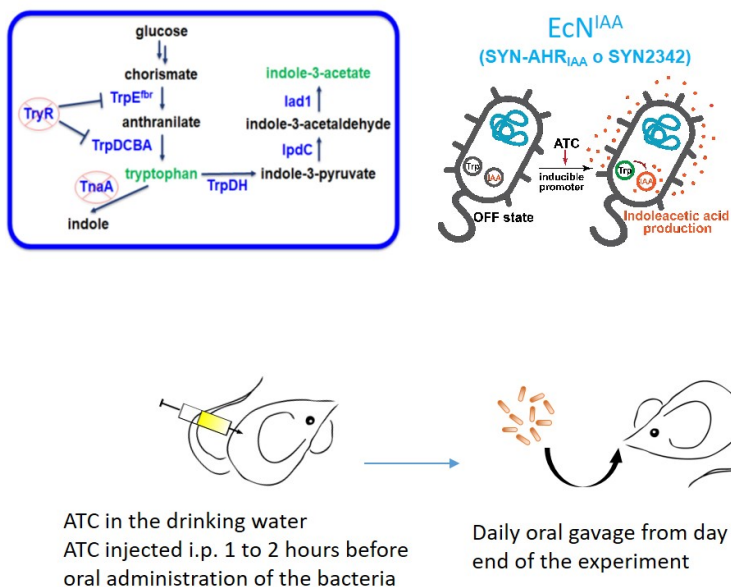
El microorganismo bacteriano *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), se adquirió originalmente de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ Braunschweig, *E. coli* DSM 6601). Se generó EcN resistente a estreptococos sembrando estas células en una placa LB que contenía 300 ng/mL de estreptomina. Se picó la única colonia formada que había mutado para ser resistente a estreptococos y designada como EcN-StrpR o SYN094 (denominada EcN en este trabajo). Los genes que codifica las proteínas responsables de la producción del precursor triptófano y del IAA se subclonaron en dos vectores plasmídicos (secuencias y estrategias no detalladas por motivos de confidencialidad) bajo el control de un promotor inducible por ATC (*Anhydrotetracycline hydrochloride*, Sigma ref. 37919). En esta estrategia también se eliminaron TryR y TnaA para garantizar la síntesis de IAA. TryR es un apopresor que al formar complejos con L-Trp se une a la región operadora del operón Trp y evita el inicio de la transcripción y también regula la biosíntesis del represor del triptófano al unirse a su región reguladora. TnaA degrada el L-trp a través de la vía del piruvato, en la primera etapa de la subvía que sintetiza indol y piruvato a partir de L-tripófano. Los plásmidos resultantes se electroporaron en EcN dando como resultado la cepa SYN-AHRIAA o SYN2342 (en nuestro trabajo nombrada como EcN<sup>IAA</sup>) (**Figura 6**). La producción de estos probióticos sintéticos corrió por parte de la empresa biofarmacéutica SYNLOGIC, INC. (SYBX).

### **22.2. Administración de los probióticos: *Gavages***

Los probióticos se administraron diariamente mediante la técnica del *gavage* comenzando 3 días antes de la inducción de la EAE y hasta el último día del experimento. Los *gavages* se llevaron a cabo mediante una sonda oral, la cual se utiliza para administrar por vía oral un volumen específico de un tratamiento determinado (**Figura 7**).

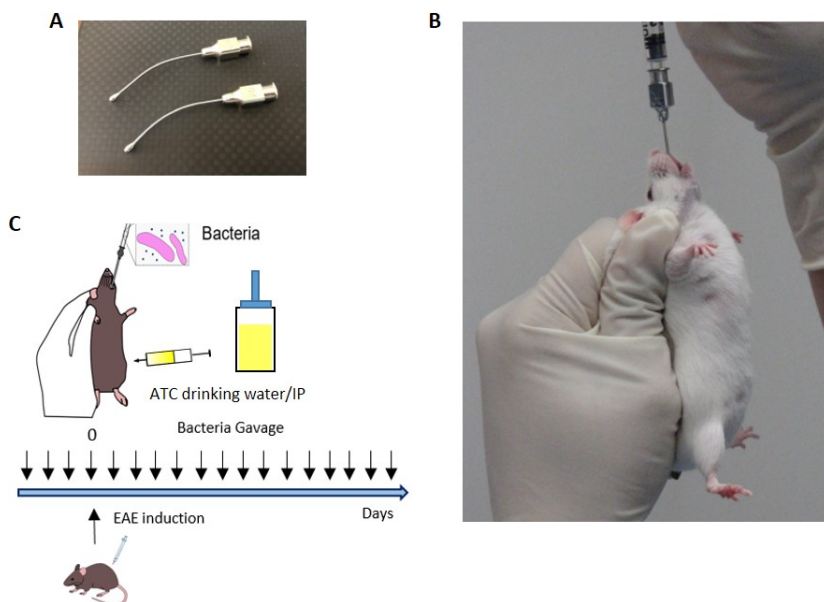
La producción del IAA por los probióticos dependía de la inducción de los

## 22. PROBIÓTICOS SINTÉTICOS



**Figura M.6: Estrategia seguida para la síntesis de EcN<sup>IAA</sup>.** Esquema simplificado de la ruta de síntesis del IAA y representación de los probióticos productores de IAA, EcN<sup>IAA</sup>.

promotores con ATC. El ATC se suministró en el agua a la concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de manera constante e ininterrumpida desde el comienzo del tratamiento con los gavages. Es importante que el agua sea mantenida en un recipiente opaco ya que este compuesto es fotosensible. Además, cada día del tratamiento los ratones recibieron una inyección intraperitoneal 1-2 h antes de los *gavages* de 10  $\mu\text{g}$  de ATC en PBS1X en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . Los viales con las bacterias se descongelaban en un baño a 37° C y se mantenían en hielo hasta el momento de su administración. Una vez descongeladas se le añadía 100 mM de NaHCO<sub>3</sub> (sodium bicarbonate) y 100 ng/ml de ATC. Todas estas preparaciones se llevaron a cabo indistintamente en todos los ratones incluidos en el experimento. Las bacterias control EcN o productora de IAA EcN<sup>IAA</sup> se prepararon paralelamente en el mismo momento siguiendo las indicaciones anteriores.



**Figura M.7: Administración de probióticos mediante *gavage*.** (A) Sondas empleadas. (B) Manejo del ratón para una correcta aplicación de la técnica (imágenes tomadas por el protocolo publicado por el *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC)). (C) Esquema representativo del diseño experimental.

### 22.3. Cinética de producción de IAA *in vitro*

Una vez que las bacterias control y productoras IAA habían sido preparadas como se mencionó anteriormente, se diluyeron en medio YT 2x (Sigma Aldrich, ref. Y1003-500ML) con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del antibiótico estreptomina, y se incubaron con agitación 250 rpm a 37° C. En los puntos de tiempo indicados, se cuantificó el IAA producido mediante espectrometría de masas en los servicios del Brigham and Women's Hospital.

## 23. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

---

### 22.4. Viabilidad de las bacterias tras la administración *in vivo*

Se recogieron heces de ratones tratados con las bacterias 4 h después de la administración de los probióticos mediante los *gavages* en los días 9 y 23. Las heces se homogeneizaron en 0,5 ml de PBS1X frío en un homogeneizador PowerLyzer 24 (Qiagen) mediante dos pulsos de 4 m/s durante 10 s y, a continuación, se centrifugaron a la velocidad máxima durante 20 min a 4 °C. Los sobrenadantes de las heces se diluyeron en serie y se sembraron en medio LB Agar con 300 µg/mL de estreptomina. Al día siguiente, se contaron las colonias formadas y se corrigió el factor de dilución para determinar las unidades formadoras de colonias o CFU (*colony forming units*).

### 22.5. Biodistribución de los probióticos

Para validar las bacterias productoras de IAA *in vivo*, se administraron bacterias de control y bacterias productoras de IAA por sonda oral. Se recogieron heces y plasma de ratones tratados con las bacterias 4 h después de la administración de los probióticos mediante los *gavages* en los días 9 y 23. El plasma se recogió en tubos heparinizados. Las heces se procesaron como se indicó en el apartado anterior. Se midió la concentración de IAA en suero y en los sobrenadantes de las heces mediante espectrometría de masas en los servicios del Brigham and Women's Hospital.

## 23. Análisis estadístico

Todos los experimentos descritos en esta Tesis Doctoral se han realizado empleando al menos tres réplicas biológicas con al menos dos replicas experimentales de cada condición. Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar (s.d.). El nivel de significancia se ha determinado gracias al análisis del test T de Student para muestras no pareadas y el método estadístico ANOVA para comparaciones múltiples de tres o más grupos. La generación de gráficos y la significación estadística han sido obtenidas empleando el *software* GraphPad 6.0.s



# Bibliografía

- [1] A. B. Okey, G. P. Bondy, M. E. Mason y col., «Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 254, n.º 22, págs. 11 636-11 648, nov. de 1979.
- [2] A. Poland y J. C. Knutson, «2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity,» eng, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 22, págs. 517-554, 1982.
- [3] W. F. Greenlee y A. Poland, «Nuclear uptake of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J and DBA/2J mice. Role of the hepatic cytosol receptor protein,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 254, n.º 19, págs. 9814-9821, oct. de 1979.
- [4] H. Reyes, S. Reisz-Porszasz y O. Hankinson, «Identification of the Ah Receptor Nuclear Translocator Protein (Arnt) as a Component of the DNA Binding Form of the Ah Receptor,» EN, *Science*, mayo de 1992.
- [5] J. Mimura, K. Yamashita, K. Nakamura y col., «Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor,» eng, *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, vol. 2, n.º 10, págs. 645-654, oct. de 1997.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [6] P. M. Fernandez-Salguero, D. M. Hilbert, S. Rudikoff, J. M. Ward y F. J. Gonzalez, «Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity,» eng, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 140, n.º 1, págs. 173-179, sep. de 1996.
- [7] Y. Shimizu, Y. Nakatsuru, M. Ichinose y col., «Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor,» en, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, n.º 2, págs. 779-782, ene. de 2000.
- [8] R. Pohjanvirta y J. Tuomisto, «Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models,» eng, *Pharmacological Reviews*, vol. 46, n.º 4, págs. 483-549, dic. de 1994.
- [9] Y. Shimizu, Y. Nakatsuru, M. Ichinose y col., «Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor,» en, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, n.º 2, págs. 779-782, ene. de 2000.
- [10] B. D. Abbott, J. E. Schmid, J. A. Pitt y col., «Adverse Reproductive Outcomes in the Transgenic Ah Receptor-Deficient Mouse,» en, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 155, n.º 1, págs. 62-70, feb. de 1999.
- [11] J. C. Benedict, T.-M. Lin, I. K. Loeffler, R. E. Peterson y J. A. Flaws, «Physiological Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Mouse Ovary Development,» *Toxicological Sciences*, vol. 56, n.º 2, págs. 382-388, ago. de 2000.
- [12] P. Fernandez-Salguero, T. Pineau, D. M. Hilbert y col., «Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor,» eng, *Science (New York, N. Y.)*, vol. 268, n.º 5211, págs. 722-726, mayo de 1995.
- [13] P. M. Fernandez-Salguero, J. M. Ward, J. P. Sundberg y F. J. Gonzalez, «Lesions of Aryl-hydrocarbon Receptor-deficient Mice,» en, *Veterinary Pathology*, vol. 34, n.º 6, págs. 605-614, nov. de 1997.

- [14] F. J. Gonzalez, P. Fernandez-Salguero, S. S. T. Lee, T. Pineau y J. M. Ward, «Xenobiotic receptor knockout mice,» en, *Toxicology Letters*, Proceedings of the International Congress of Toxicology - VII, vol. 82-83, págs. 117-121, dic. de 1995.
- [15] G. Lahvis, S. Lindell, R. Thomas y col., «Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, n.º 19, págs. 10 442-10 447, 2000.
- [16] M. E. Hahn, «Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution,» eng, *Chemico-Biological Interactions*, vol. 141, n.º 1-2, págs. 131-160, sep. de 2002.
- [17] B. D. Abbott, L. S. Birnbaum y J. J. Diliberto, «Rapid distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to embryonic tissues in C57BL/6N mice and correlation with palatal uptake in vitro,» en, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 141, n.º 1, págs. 256-263, nov. de 1996.
- [18] T. Baba, J. Mimura, N. Nakamura y col., «Intrinsic Function of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor as a Key Factor in Female Reproduction,» *Molecular and Cellular Biology*, vol. 25, n.º 22, págs. 10 040-10 051, nov. de 2005.
- [19] R. Barouki, X. Coumoul y P. M. Fernandez-Salguero, «The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein,» en, *FEBS Letters*, vol. 581, n.º 19, págs. 3608-3615, jul. de 2007.
- [20] G. Elizondo, P. Fernandez-Salguero, M. S. Sheikh y col., «Altered Cell Cycle Control at the G2/M Phases in Aryl Hydrocarbon Receptor-Null Embryo Fibroblast,» en, *Molecular Pharmacology*, vol. 57, n.º 5, págs. 1056-1063, mayo de 2000.
- [21] R. Pohjanvirta, H. Miettinen, S. Sankari, N. Hegde y J. Lindén, «Unexpected gender difference in sensitivity to the acute toxicity of dioxin in mice,»

## BIBLIOGRAFÍA

---

- en, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 262, n.º 2, págs. 167-176, jul. de 2012.
- [22] A. Puga, C. R. Tomlinson e Y. Xia, «Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways,» en, *Biochemical Pharmacology*, vol. 69, n.º 2, págs. 199-207, ene. de 2005.
- [23] Y. Fujii-Kuriyama y K. Kawajiri, «Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli,» eng, *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, vol. 86, n.º 1, págs. 40-53, 2010.
- [24] A. Puga, Y. Xia y C. Elferink, «Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation,» en, *Chemico-Biological Interactions*, vol. 141, n.º 1, págs. 117-130, sep. de 2002.
- [25] T. Ogi, J. Mimura, M. Hikida, H. Fujimoto, Y. Fujii-Kuriyama y H. Ohmori, «Expression of human and mouse genes encoding pol $\kappa$ : testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription,» en, *Genes to Cells*, vol. 6, n.º 11, págs. 943-953, 2001.
- [26] S. K. Kolluri, C. Balduf, M. Hofmann y M. Göttlicher, «Novel Target Genes of the Ah (Dioxin) Receptor: Transcriptional Induction of N-Myristoyltransferase 2,» en, *Cancer Research*, vol. 61, n.º 23, págs. 8534-8539, dic. de 2001.
- [27] S. K. Kolluri, C. Weiss, A. Koff y M. Göttlicher, «p27Kip1 induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells,» en, *Genes & Development*, vol. 13, n.º 13, págs. 1742-1753, ene. de 1999.
- [28] T. Matikainen, G. I. Perez, A. Jurisicova y col., «Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals,» en, *Nature Genetics*, vol. 28, n.º 4, págs. 355-360, ago. de 2001.

- [29] T. Niermann, S. Schmutz, P. Erne y T. Resink, «Aryl hydrocarbon receptor ligands repress T-cadherin expression in vascular smooth muscle cells,» en, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 300, n.º 4, págs. 943-949, ene. de 2003.
- [30] X. Yang, D. Liu, T. J. Murray y col., «The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells,» en, *Oncogene*, vol. 24, n.º 53, págs. 7869-7881, nov. de 2005.
- [31] T. Ikuta y K. Kawajiri, «Zinc finger transcription factor Slug is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor,» en, *Experimental Cell Research*, vol. 312, n.º 18, págs. 3585-3594, nov. de 2006.
- [32] J. M. Carvajal-Gonzalez, S. Mulero-Navarro, A. C. Roman y col., «The Dioxin Receptor Regulates the Constitutive Expression of the Vav3 Proto-Oncogene and Modulates Cell Shape and Adhesion,» *Molecular Biology of the Cell*, vol. 20, n.º 6, págs. 1715-1727, mar. de 2009.
- [33] A. Gomez-Duran, E. Ballestar, J. M. Carvajal-Gonzalez y col., «Recruitment of CREB1 and Histone Deacetylase 2 (HDAC2) to the Mouse Ltbp-1 Promoter Regulates its Constitutive Expression in a Dioxin Receptor-dependent Manner,» en, *Journal of Molecular Biology*, vol. 380, n.º 1, págs. 1-16, jun. de 2008.
- [34] T. Ikuta, M. Ohba, C. C. Zouboulis, Y. Fujii-Kuriyama y K. Kawajiri, «B lymphocyte-induced maturation protein 1 is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor,» en, *Journal of Dermatological Science*, vol. 58, n.º 3, págs. 211-216, jun. de 2010.
- [35] D. R. Boverhof, L. D. Burgoon, C. Tashiro y col., «Temporal and Dose-Dependent Hepatic Gene Expression Patterns in Mice Provide New Insights into TCDD-Mediated Hepatotoxicity,» *Toxicological Sciences*, vol. 85, n.º 2, págs. 1048-1063, jun. de 2005.
- [36] M. Frericks, M. Meissner y C. Esser, «Microarray analysis of the AHR system: Tissue-specific flexibility in signal and target genes,» en, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 220, n.º 3, págs. 320-332, mayo de 2007.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [37] N. Tijet, P. C. Boutros, I. D. Moffat, A. B. Okey, J. Tuomisto y R. Pohjanvirta, «Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Distinct Dioxin-Dependent and Dioxin-Independent Gene Batteries,» en, *Molecular Pharmacology*, vol. 69, n.º 1, págs. 140-153, ene. de 2006.
- [38] F. J. González-Rico, C. Vicente-García, A. Fernández y col., «Alu retrotransposons modulate Nanog expression through dynamic changes in regional chromatin conformation via aryl hydrocarbon receptor,» eng, *Epigenetics & Chromatin*, vol. 13, n.º 1, pág. 15, mar. de 2020.
- [39] A. Morales-Hernández, F. J. González-Rico, A. C. Román y col., «Alu retrotransposons promote differentiation of human carcinoma cells through the aryl hydrocarbon receptor,» eng, *Nucleic Acids Research*, vol. 44, n.º 10, págs. 4665-4683, jun. de 2016.
- [40] A. Nacarino-Palma, F. J. González-Rico, C. M. Rejano-Gordillo, A. Ordiales-Talavera, J. M. Merino y P. M. Fernández-Salguero, «The aryl hydrocarbon receptor promotes differentiation during mouse preimplantational embryo development,» eng, *Stem Cell Reports*, vol. 16, n.º 9, págs. 2351-2363, sep. de 2021.
- [41] Y. Tian, S. Ke, M. S. Denison, A. B. Rabson y M. A. Gallo, «Ah Receptor and NF- $\kappa$ B Interactions, a Potential Mechanism for Dioxin Toxicity \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n.º 1, págs. 510-515, ene. de 1999.
- [42] G. Huang y C. J. Elferink, «Multiple Mechanisms Are Involved in Ah Receptor-Mediated Cell Cycle Arrest,» en, *Molecular Pharmacology*, vol. 67, n.º 1, págs. 88-96, ene. de 2005.
- [43] C. M. Klinge, J. L. Bowers, P. C. Kulakosky, K. K. Kamboj y H. I. Swanson, «The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements,» en, *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 157, n.º 1, págs. 105-119, nov. de 1999.

- [44] M. Wormke, M. Stoner, B. Saville y S. Safe, «Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes,» eng, *FEBS letters*, vol. 478, n.º 1-2, págs. 109-112, jul. de 2000.
- [45] Z. Tan, X. Chang, A. Puga e Y. Xia, «Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function,» en, *Biochemical Pharmacology*, Cell Signaling, Transcription and Translation as Therapeutic Targets, vol. 64, n.º 5, págs. 771-780, sep. de 2002.
- [46] F. Ohtake, K.-i. Takeyama, T. Matsumoto y col., «Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor,» en, *Nature*, vol. 423, n.º 6939, págs. 545-550, mayo de 2003.
- [47] M. Wormke, M. Stoner, B. Saville y col., «The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes,» eng, *Molecular and Cellular Biology*, vol. 23, n.º 6, págs. 1843-1855, mar. de 2003.
- [48] A. Blankenship y F. Matsumura, «2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) causes an Ah receptor-dependent and ARNT-independent increase in membrane levels and activity of p60(Src),» eng, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 3, n.º 3, págs. 211-220, jul. de 1997.
- [49] C. F. A. Vogel, E. Sciullo, S. Park, C. Liedtke, C. Trautwein y F. Matsumura, «Dioxin Increases C/EBP $\beta$  Transcription by Activating cAMP/Protein Kinase A \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, n.º 10, págs. 8886-8894, mar. de 2004.
- [50] J. Rey-Barroso, G. P. Colo, A. Alvarez-Barrientos y col., «The dioxin receptor controls  $\beta$ 1 integrin activation in fibroblasts through a Cbp–Csk–Src pathway,» en, *Cellular Signalling*, vol. 25, n.º 4, págs. 848-859, abr. de 2013.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [51] J. Rey-Barroso, A. Alvarez-Barrientos, E. Rico-Leo y col., «The Dioxin receptor modulates Caveolin-1 mobilization during directional migration: role of cholesterol,» *Cell Communication and Signaling*, vol. 12, n.º 1, pág. 57, sep. de 2014.
- [52] F. Ohtake, A. Baba, I. Takada y col., «Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase,» en *Nature*, vol. 446, n.º 7135, págs. 562-566, mar. de 2007.
- [53] K. M. Burbach, A. Poland y C. A. Bradfield, «Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor,» eng, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, n.º 17, págs. 8185-8189, sep. de 1992.
- [54] M. Ema, K. Sogawa, N. Watanabe y col., «cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor,» en *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 184, n.º 1, págs. 246-253, abr. de 1992.
- [55] D. Alexander, L. Ganem, P. Fernandez-Salguero, F. Gonzalez y C. Jefcoate, «Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis,» *Journal of Cell Science*, vol. 111, n.º 22, págs. 3311-3322, nov. de 1998.
- [56] W. K. Chan, G. Yao, Y.-Z. Gu y C. A. Bradfield, «Cross-talk between the Aryl Hydrocarbon Receptor and Hypoxia Inducible Factor Signaling Pathways: DEMONSTRATION OF COMPETITION AND COMPENSATION \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n.º 17, págs. 12 115-12 123, abr. de 1999.
- [57] B. N. Fukunaga, M. R. Probst, S. Reisz-Porszasz y O. Hankinson, «Identification of Functional Domains of the Aryl Hydrocarbon Receptor (\*),» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, n.º 49, págs. 29 270-29 278, dic. de 1995.
- [58] M. Sonnenfeld, M Ward, G Nystrom, J Mosher, S Stahl y C. ST, «The *Drosophila tango* gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to



- mammalian ARNT and controls CNS midline and tracheal development,» *Development (Cambridge, England)*, vol. 124, págs. 4571-82, dic. de 1997.
- [59] J. P. Whitlock, «Induction of Cytochrome P4501a1,» *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 39, n.º 1, págs. 103-125, 1999.
- [60] P. Berg e I. Pongratz, «Differential usage of nuclear export sequences regulates intracellular localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n.º 46, págs. 43 231-43 238, nov. de 2001.
- [61] T. Ikuta, H. Eguchi, T. Tachibana, Y. Yoneda y K. Kawajiri, «Nuclear Localization and Export Signals of the Human Aryl Hydrocarbon Receptor \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, n.º 5, págs. 2895-2904, ene. de 1998.
- [62] M. Procopio, A. Lahm, A. Tramontano, L. Bonati y D. Pitea, «A model for recognition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by the aryl hydrocarbon receptor,» en, *European Journal of Biochemistry*, vol. 269, n.º 1, págs. 13-18, 2002.
- [63] G. H. Perdew, «Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein.,» en, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, n.º 27, págs. 13 802-13 805, sep. de 1988.
- [64] A. Kazlauskas, L. Poellinger e I. Pongratz, «Evidence That the Co-chaperone p23 Regulates Ligand Responsiveness of the Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n.º 19, págs. 13 519-13 524, mayo de 1999.
- [65] B. K. Meyer, M. G. Pray-Grant, J. P. V. Heuvel y G. H. Perdew, «Hepatitis B Virus X-Associated Protein 2 Is a Subunit of the Unliganded Aryl Hydrocarbon Receptor Core Complex and Exhibits Transcriptional Enhancer Activity,» EN, *Molecular and Cellular Biology*, feb. de 1998.
- [66] L. A. Carver y C. A. Bradfield, «Ligand-dependent Interaction of the Aryl Hydrocarbon Receptor with a Novel Immunophilin Homolog in Vivo\*,»

## BIBLIOGRAFÍA

---

- English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, n.º 17, págs. 11 452-11 456, abr. de 1997.
- [67] Q. Ma y J. P. Whitlock, «A Novel Cytoplasmic Protein That Interacts with the Ah Receptor, Contains Tetratricopeptide Repeat Motifs, and Augments the Transcriptional Response to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin \*», English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, n.º 14, págs. 8878-8884, abr. de 1997.
- [68] N. A. Davarinos y R. S. Pollenz, «Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n.º 40, págs. 28 708-28 715, oct. de 1999.
- [69] B. J. Roberts y M. L. Whitelaw, «Degradation of the Basic Helix-Loop-Helix/Per-ARNT-Sim Homology Domain Dioxin Receptor Via the Ubiquitin/Proteasome Pathway \*», English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n.º 51, págs. 36 351-36 356, dic. de 1999.
- [70] A. Wilhelmsson, S. Cuthill, M. Denis, A. C. Wikström, J. A. Gustafsson y L. Poellinger, «The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heat shock protein,» eng, *The EMBO journal*, vol. 9, n.º 1, págs. 69-76, ene. de 1990.
- [71] R. S. Pollenz, S. E. Wilson y E. J. Dougherty, «Role of Endogenous XAP2 Protein on the Localization and Nucleocytoplasmic Shuttling of the Endogenous Mouse Ahb-1 Receptor in the Presence and Absence of Ligand,» en, *Molecular Pharmacology*, vol. 70, n.º 4, págs. 1369-1379, oct. de 2006.
- [72] J. C. Rowlands y J.-Å. Gustafsson, «Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Signal Transduction,» *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 27, n.º 2, págs. 109-134, ene. de 1997.
- [73] R. S. Pollenz, C. A. Sattler y A. Poland, «The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence

- microscopy.» en, *Molecular Pharmacology*, vol. 45, n.º 3, págs. 428-438, mar. de 1994.
- [74] A. Kazlauskas, S. Sundström, L. Poellinger e I. Pongratz, «The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor,» eng, *Molecular and Cellular Biology*, vol. 21, n.º 7, págs. 2594-2607, abr. de 2001.
- [75] M. J. Lees y M. L. Whitelaw, «Multiple Roles of Ligand in Transforming the Dioxin Receptor to an Active Basic Helix-Loop-Helix/PAS Transcription Factor Complex with the Nuclear Protein Arnt,» EN, *Molecular and Cellular Biology*, ago. de 1999.
- [76] A. Kobayashi, K. Numayama-Tsuruta, K. Sogawa e Y. Fujii-Kuriyama, «CBP/p300 Functions as a Possible Transcriptional Coactivator of Ah Receptor Nuclear Translocator (Arnt)1,» *The Journal of Biochemistry*, vol. 122, n.º 4, págs. 703-710, oct. de 1997.
- [77] M. B. Kumar, P. Ramadoss, R. K. Reen, J. P. V. Heuvel y G. H. Perdew, «The Q-rich Subdomain of the Human AhReceptor Transactivation Domain Is Required for Dioxin-mediated Transcriptional Activity \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n.º 45, págs. 42 302-42 310, nov. de 2001.
- [78] T. V. Beischlag, S. Wang, D. W. Rose y col., «Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 Family of Transcriptional Coactivators by the Aryl Hydrocarbon Receptor/Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Complex,» EN, *Molecular and Cellular Biology*, jun. de 2002.
- [79] M. B. Kumar, R. W. Tarpey y G. H. Perdew, «Differential Recruitment of Coactivator RIP140 by Ah and Estrogen Receptors: ABSENCE OF A ROLE FOR LXXLL MOTIFS \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n.º 32, págs. 22 155-22 164, ago. de 1999.
- [80] C. M. Klinge, S. C. Jernigan, K. E. Risinger y col., «Short Heterodimer Partner (SHP) Orphan Nuclear Receptor Inhibits the Transcriptional Activity of Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR)/AHR Nuclear Translocator

## BIBLIOGRAFÍA

---

- (ARNT),» en, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 390, n.º 1, págs. 64-70, jun. de 2001.
- [81] T. A. Nguyen, D. Hoivik, J.-E. Lee y S. Safe, «Interactions of Nuclear Receptor Coactivator/Corepressor Proteins with the Aryl Hydrocarbon Receptor Complex,» en, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 367, n.º 2, págs. 250-257, jul. de 1999.
- [82] S. Wang y O. Hankinson, «Functional involvement of the Brahma/SWI2-related gene 1 protein in cytochrome P4501A1 transcription mediated by the aryl hydrocarbon receptor complex,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n.º 14, págs. 11 821-11 827, abr. de 2002.
- [83] S. Wang, B. Zhang y D. V. Faller, «BRG1/BRM and prohibitin are required for growth suppression by estrogen antagonists,» eng, *The EMBO journal*, vol. 23, n.º 11, págs. 2293-2303, jun. de 2004.
- [84] H. P. Ko, S. T. Okino, Q. Ma y J. J P Whitlock, «Transactivation domains facilitate promoter occupancy for the dioxin-inducible CYP1A1 gene in vivo,» EN, *Molecular and Cellular Biology*, jul. de 1997.
- [85] A. Kobayashi, K Sogawa e Y Fujii-Kuriyama, «Cooperative interaction between AhR.Arnt and Sp1 for the drug-inducible expression of CYP1A1 gene,» *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, págs. 12 310-6, jun. de 1996.
- [86] J. Matthews, B. Wihlén, J. Thomsen y J.-Å. Gustafsson, «Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Transcription: Ligand-Dependent Recruitment of Estrogen Receptor  $\alpha$  to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- p-Dioxin-Responsive Promoters,» EN, *Molecular and Cellular Biology*, jul. de 2005.
- [87] S. Barnes-Ellerbe, K. E. Knudsen y A. Puga, «2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Blocks Androgen-Dependent Cell Proliferation of LNCaP Cells through Modulation of pRB Phosphorylation,» en, *Molecular Pharmacology*, vol. 66, n.º 3, págs. 502-511, sep. de 2004.

- [88] J. Huan, N. Culbertson, L. Spencer y col., «Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients,» eng, *Journal of Neuroscience Research*, vol. 81, n.º 1, págs. 45-52, jul. de 2005.
- [89] J. L. Marlowe, E. S. Knudsen, S. Schwemberger y A. Puga, «The aryl hydrocarbon receptor displaces p300 from E2F-dependent promoters and represses S phase-specific gene expression,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, n.º 28, págs. 29 013-29 022, jul. de 2004.
- [90] H. Park, «Aromatic hydrocarbon nuclear translocator as a common component for the hypoxia- and dioxin-induced gene expression,» eng, *Molecules and Cells*, vol. 9, n.º 2, págs. 172-178, abr. de 1999.
- [91] L. C. Jones, S. T. Okino, T. J. Gonda y J. P. Whitlock, «Myb-binding Protein 1a Augments AhR-dependent Gene Expression \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n.º 25, págs. 22 515-22 519, jun. de 2002.
- [92] M. Antenos, R. F. Casper y T. J. Brown, «Interaction with Nedd8, a Ubiquitin-like Protein, Enhances the Transcriptional Activity of the Aryl Hydrocarbon Receptor \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n.º 46, págs. 44 028-44 034, nov. de 2002.
- [93] Q. Ma y K. T. Baldwin, «2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced Degradation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) by the Ubiquitin-Proteasome Pathway: ROLE OF THE TRANSCRIPTION ACTIVATON AND DNA BINDING OF AhR \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n.º 12, págs. 8432-8438, mar. de 2000.
- [94] B. Santiago-Josefat, E. Pozo-Guisado, S. Mulero-Navarro y P. M. Fernandez-Salguero, «Proteasome Inhibition Induces Nuclear Translocation and Transcriptional Activation of the Dioxin Receptor in Mouse Embryo Primary Fibroblasts in the Absence of Xenobiotics,» EN, *Molecular and Cellular Biology*, mar. de 2001.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [95] T. Ikuta, T. Tachibana, J. Watanabe, M. Yoshida, Y. Yoneda y K. Kawajiri, «Nucleocytoplasmic Shuttling of the Aryl Hydrocarbon Receptor,» *The Journal of Biochemistry*, vol. 127, n.º 3, págs. 503-509, 2000.
- [96] C. A. Richter, D. E. Tillitt y M. Hannink, «Regulation of Subcellular Localization of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR),» en, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 389, n.º 2, págs. 207-217, mayo de 2001.
- [97] S. S. Singh, N. G. Hord y 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,» en, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 329, n.º 1, págs. 47-55, mayo de 1996.
- [98] T. Ikuta, Y. Kobayashi y K. Kawajiri, «Cell Density Regulates Intracellular Localization of Aryl Hydrocarbon Receptor \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, n.º 18, págs. 19 209-19 216, abr. de 2004.
- [99] C. M. Sadek y B. L. Allen-Hoffmann, «Cytochrome P450IA1 is rapidly induced in normal human keratinocytes in the absence of xenobiotics.,» en, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, n.º 23, págs. 16 067-16 074, jun. de 1994.
- [100] Y. C. Cho, W. Zheng y C. R. Jefcoate, «Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts,» en, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Mechanisms Regulating Enzymes Involved in Xenobiotic Disposition: A Tribute to Ed Bresnick, vol. 199, n.º 3, págs. 220-238, sep. de 2004.
- [101] F. Carrier, R. A. Owens, D. W. Nebert y A. Puga, «Dioxin-dependent activation of murine Cyp1a-1 gene transcription requires protein kinase C-dependent phosphorylation,» EN, *Molecular and Cellular Biology*, abr. de 1992.
- [102] Y.-H. Chen y R. H. Tukey, «Protein Kinase C Modulates Regulation of the CYP1A1 Gene by the Aryl Hydrocarbon Receptor \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, n.º 42, págs. 26 261-26 266, oct. de 1996.

- [103] S. K. d. Oliveira, M. Hoffmeister, S. Gambaryan, W. Müller-Esterl, J. A. Guimaraes y A. P. Smolenski, «Phosphodiesterase 2A Forms a Complex with the Co-chaperone XAP2 and Regulates Nuclear Translocation of the Aryl Hydrocarbon Receptor \*», English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, n.º 18, págs. 13 656-13 663, mayo de 2007.
- [104] Z. Song y R. S. Pollenz, «Ligand-dependent and independent modulation of aryl hydrocarbon receptor localization, degradation, and gene regulation», eng, *Molecular Pharmacology*, vol. 62, n.º 4, págs. 806-816, oct. de 2002.
- [105] B. Santiago-Josefat y P. M. Fernandez-Salguero, «Proteasome inhibition induces nuclear translocation of the dioxin receptor through an Sp1 and protein kinase C-dependent pathway», eng, *Journal of Molecular Biology*, vol. 333, n.º 2, págs. 249-260, oct. de 2003.
- [106] G. D. Minsavage, S.-k. Park y T. A. Gasiewicz, «The Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Tyrosine 9, a Residue That Is Essential for AhR DNA Binding Activity, Is Not a Phosphoresidue but Augments AhR Phosphorylation \*», English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, n.º 20, págs. 20 582-20 593, mayo de 2004.
- [107] E. Enan y F. Matsumura, «Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway», en, *Biochemical Pharmacology*, vol. 52, n.º 10, págs. 1599-1612, nov. de 1996.
- [108] C. Köhle, H. Gschaidmeier, D. Lauth, S. Topell, H. Zitzer y K. W. Bock, «2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- p -dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells», en, *Archives of Toxicology*, vol. 73, n.º 3, págs. 152-158, jun. de 1999.
- [109] B. Oesch-Bartlomowicz, A. Huelster, O. Wiss y col., «Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways», eng, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, n.º 26, págs. 9218-9223, jun. de 2005.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [110] B. E. Gillesby, M. Stanostefano, W. Porter, S. Safe, Z. F. Wu y T. R. Zacharewski, «Identification of a Motif within the 5' Regulatory Region of pS2 Which Is Responsible for AP-1 Binding and TCDD-Mediated Suppression,» en, *Biochemistry*, vol. 36, n.º 20, págs. 6080-6089, mayo de 1997.
- [111] A. C. Román, F. J. González-Rico y P. M. Fernandez-Salguero, «B1-SINE retrotransposons,» *Mobile Genetic Elements*, vol. 1, n.º 1, págs. 66-70, mayo de 2011.
- [112] S. Safe, F. Wang, W. Porter, R. Duan y A. McDougal, «Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms,» eng, *Toxicology Letters*, vol. 102-103, págs. 343-347, dic. de 1998.
- [113] J. Mimura, M. Ema, K. Sogawa e Y. Fujii-Kuriyama, «Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function,» en, *Genes & Development*, vol. 13, n.º 1, págs. 20-25, ene. de 1999.
- [114] C. M. Sadek, S. Jalaguier, E. P. Feeney y col., «Isolation and characterization of AINT: a novel ARNT interacting protein expressed during murine embryonic development,» eng, *Mechanisms of Development*, vol. 97, n.º 1-2, págs. 13-26, oct. de 2000.
- [115] Q. Ma, A. J. Renzelli, K. T. Baldwin y J. M. Antonini, «Superinduction of CYP1A1 gene expression. Regulation of 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of Ah receptor by cycloheximide,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n.º 17, págs. 12 676-12 683, abr. de 2000.
- [116] T. Bernshausen, B. Jux, C. Esser, J. Abel y E. Fritsche, «Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice,» en, *Archives of Toxicology*, vol. 80, n.º 4, págs. 206-211, abr. de 2006.
- [117] R. S. Pollenz, «The aryl-hydrocarbon receptor, but not the aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, is rapidly depleted in hepatic and nonhepatic culture cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin,» eng, *Molecular Pharmacology*, vol. 49, n.º 3, págs. 391-398, mar. de 1996.



- [118] M. E. Hahn, S. I. Karchner, M. A. Shapiro y S. A. Perera, «Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family,» en *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, n.º 25, págs. 13 743-13 748, dic. de 1997.
- [119] C.-Y. Chang y A. Puga, «Constitutive Activation of the Aromatic Hydrocarbon Receptor,» EN, *Molecular and Cellular Biology*, ene. de 1998.
- [120] Q. Ma y J. J P Whitlock, «The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin,» EN, *Molecular and Cellular Biology*, mayo de 1996.
- [121] C. Weiß, S. K. Kolluri, F. Kiefer y M. Göttlicher, «Complementation of Ah Receptor Deficiency in Hepatoma Cells: Negative Feedback Regulation and Cell Cycle Control by the Ah Receptor,» en, *Experimental Cell Research*, vol. 226, n.º 1, págs. 154-163, jul. de 1996.
- [122] Y.-H. Chen, J. Riby, P. Srivastava, J. Bartholomew, M. Denison y L. Bjeldanes, «Regulation of CYP1A1 by Indolo[3,2-b]carbazole in Murine Hepatoma Cells (\*),» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, n.º 38, págs. 22 548-22 555, sep. de 1995.
- [123] Y.-D. Wei, H. Helleberg, U. Rannug y A. Rannug, «Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole,» en, *Chemico-Biological Interactions*, vol. 110, n.º 1, págs. 39-55, mar. de 1998.
- [124] H. P. Ciolino, T. T. Y. Wang y G. C. Yeh, «Diosmin and Diosmetin Are Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor That Differentially Affect Cytochrome P450 1A1 Activity,» en, *Cancer Research*, vol. 58, n.º 13, págs. 2754-2760, jul. de 1998.
- [125] C. M. Schaldach, J. Riby y L. F. Bjeldanes, «Lipoxin A4: A New Class of Ligand for the Ah Receptor,» *Biochemistry*, vol. 38, n.º 23, págs. 7594-7600, jun. de 1999.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [126] C. J. Sinal y J. R. Bend, «Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Induction of Cyp1a1 by Bilirubin in Mouse Hepatoma Hepa 1c1c7 Cells,» en, *Molecular Pharmacology*, vol. 52, n.º 4, págs. 590-599, oct. de 1997.
- [127] J.-F. Savouret, M. Antenos, M. Quesne, J. Xu, E. Milgrom y R. F. Casper, «7-Ketocholesterol Is an Endogenous Modulator for the Arylhydrocarbon Receptor \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n.º 5, págs. 3054-3059, feb. de 2001.
- [128] Y.-F. Lu, M. Santostefano, B. D. M. Cunningham, M. D. Threadgill y S. Safe, «Substituted flavones as aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists and antagonists,» en, *Biochemical Pharmacology*, vol. 51, n.º 8, págs. 1077-1087, abr. de 1996.
- [129] J. Adachi, Y. Mori, S. Matsui y col., «Indirubin and Indigo Are Potent Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Present in Human Urine \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n.º 34, págs. 31 475-31 478, ago. de 2001.
- [130] A. L. Blankenship, M. C. Suffia, F. Matsumura, K. J. Walsh y L. M. Wiley, «2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) accelerates differentiation of murine preimplantation embryos in vitro,» en, *Reproductive Toxicology*, vol. 7, n.º 3, págs. 255-261, mayo de 1993.
- [131] J. C. Knutson y A. Poland, «2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Toxicity in vivo and in vitro,» en, en *Toxicology of Halogenated Hydrocarbons*, M. A. Q. Khan y R. H. Stanton, eds., Pergamon, ene. de 1981, págs. 187-201.
- [132] F. J. Gonzalez y P. Fernandez-Salguero, «The Aryl Hydrocarbon Receptor: Studies Using the AHR-Null Mice,» en, *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 26, n.º 12, págs. 1194-1198, dic. de 1998.
- [133] N. Moreno-Marín, J. M. Merino, A. Alvarez-Barrientos y col., «Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes Liver Polyploidization and Inhibits PI3K, ERK, and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling,» en, *iScience*, vol. 4, págs. 44-63, jun. de 2018.

- [134] J. V. Schmidt y C. A. Bradfield, «Ah receptor signaling pathways,» *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 12, n.º 1, págs. 55-89, nov. de 1996.
- [135] A. K. Lund, M. B. Goens, N. L. Kanagy y M. K. Walker, «Cardiac hypertrophy in Aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure,» en, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 193, n.º 2, págs. 177-187, dic. de 2003.
- [136] E. M. Rico-Leo, N. Moreno-Marín, F. J. González-Rico y col., «piRNA-associated proteins and retrotransposons are differentially expressed in murine testis and ovary of aryl hydrocarbon receptor deficient mice,» eng, *Open Biology*, vol. 6, n.º 12, dic. de 2016.
- [137] V. Sauzeau, J. M. Carvajal-González, A. S. Riobos y col., «Transcriptional Factor Aryl Hydrocarbon Receptor (Ahr) Controls Cardiovascular and Respiratory Functions by Regulating the Expression of the Vav3 Protooncogene \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, n.º 4, págs. 2896-2909, ene. de 2011.
- [138] E. A. Thackaberry, D. M. Gabaldon, M. K. Walker y S. M. Smith, «Aryl hydrocarbon receptor null mice develop cardiac hypertrophy and increased hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the absence of cardiac hypoxia,» en, *Cardiovascular Toxicology*, vol. 2, n.º 4, págs. 263-273, dic. de 2002.
- [139] F. Andreola, P. M. Fernandez-Salguero, M. V. Chiantore, M. P. Petkovich, F. J. Gonzalez y L. M. De Luca, «Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR-/-) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism,» eng, *Cancer Research*, vol. 57, n.º 14, págs. 2835-2838, jul. de 1997.
- [140] F. Andreola, D. F. Calvisi, G. Elizondo y col., «Reversal of liver fibrosis in aryl hydrocarbon receptor null mice by dietary vitamin A depletion,» en, *Hepatology*, vol. 39, n.º 1, págs. 157-166, 2004.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [141] J. Corchero, G. Martín-Partido, S. L. Dallas y P. M. Fernández-Salguero, «Liver portal fibrosis in dioxin receptor-null mice that overexpress the latent transforming growth factor- $\beta$ -binding protein-1,» en, *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 85, n.º 5, págs. 295-302, 2004.
- [142] A. Gomez-Duran, S. Mulero-Navarro, X. Chang y P. M. Fernandez-Salguero, «LTBP-1 blockade in dioxin receptor-null mouse embryo fibroblasts decreases TGF- $\beta$  activity: Role of extracellular proteases plasmin and elastase,» en, *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 97, n.º 2, págs. 380-392, 2006.
- [143] C. J. Elferink, N.-L. Ge y A. Levine, «Maximal Aryl Hydrocarbon Receptor Activity Depends on an Interaction with the Retinoblastoma Protein,» en, *Molecular Pharmacology*, vol. 59, n.º 4, págs. 664-673, abr. de 2001.
- [144] D. W. Nebert, A. L. Roe, M. Z. Dieter, W. A. Solis, Y. Yang y T. P. Dalton, «Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis,» en, *Biochemical Pharmacology*, vol. 59, n.º 1, págs. 65-85, ene. de 2000.
- [145] D. M. Phelan, W. R. Brackney y M. S. Denison, «The Ah Receptor Can Bind Ligand in the Absence of Receptor-Associated Heat-Shock Protein 90,» en, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 353, n.º 1, págs. 47-54, mayo de 1998.
- [146] J. M. Carvajal-Gonzalez, A. C. Roman, M. I. Cerezo-Guisado, E. M. Rico-Leo, G. Martin-Partido y P. M. Fernandez-Salguero, «Loss of dioxin-receptor expression accelerates wound healing in vivo by a mechanism involving TGF $\beta$ ,» *Journal of Cell Science*, vol. 122, n.º 11, págs. 1823-1833, jun. de 2009.
- [147] E. M. Rico-Leo, A. Alvarez-Barrientos y P. M. Fernandez-Salguero, «Dioxin Receptor Expression Inhibits Basal and Transforming Growth Factor  $\beta$ -induced Epithelial-to-mesenchymal Transition \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, n.º 11, págs. 7841-7856, mar. de 2013.

- [148] A. C. Roman, J. M. Carvajal-Gonzalez, E. M. Rico-Leo y P. M. Fernandez-Salguero, «Dioxin receptor deficiency impairs angiogenesis by a mechanism involving VEGF-A depletion in the endothelium and transforming growth factor-beta overexpression in the stroma,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, n.º 37, págs. 25 135-25 148, sep. de 2009.
- [149] A. C. Roman, D. A. Benitez, J. M. Carvajal-Gonzalez y P. M. Fernandez-Salguero, «Genome-wide B1 retrotransposon binds the transcription factors dioxin receptor and Slug and regulates gene expression in vivo,» en, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, n.º 5, págs. 1632-1637, feb. de 2008.
- [150] A. Morales-Hernández, A. Nacarino-Palma, N. Moreno-Marín y col., «Lung regeneration after toxic injury is improved in absence of dioxin receptor,» en, *Stem Cell Research*, vol. 25, págs. 61-71, dic. de 2017.
- [151] N. Moreno-Marín, E. Barrasa, A. Morales-Hernández y col., «Dioxin Receptor Adjusts Liver Regeneration After Acute Toxic Injury and Protects Against Liver Carcinogenesis,» en, *Scientific Reports*, vol. 7, n.º 1, pág. 10 420, dic. de 2017.
- [152] E. M. Rico-Leo, L. F. Lorenzo-Martín, Á. C. Román, X. R. Bustelo, J. M. Merino y P. M. Fernández-Salguero, «Aryl hydrocarbon receptor controls skin homeostasis, regeneration, and hair follicle cycling by adjusting epidermal stem cell function,» en, *STEM CELLS*, vol. 39, n.º 12, págs. 1733-1750, 2021.
- [153] M. Nie, A. L. Blankenship y J. P. Giesy, «Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways,» en, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 10, n.º 1, págs. 17-27, jun. de 2001.
- [154] H. Ashida, S. Nagy y F. Matsumura, «2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced changes in activities of nuclear protein kinases and phosphatases affecting DNA binding activity of c-Myc and AP-1 in the livers of guinea pigs,» en, *Biochemical Pharmacology*, vol. 59, n.º 7, págs. 741-751, abr. de 2000.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [155] M. Abdelrahim, R. Smith y S. Safe, «Aryl Hydrocarbon Receptor Gene Silencing with Small Inhibitory RNA Differentially Modulates Ah-Responsiveness in MCF-7 and HepG2 Cancer Cells,» en, *Molecular Pharmacology*, vol. 63, n.º 6, págs. 1373-1381, jun. de 2003.
- [156] N. R. Jana, S. Sarkar, M. Ishizuka, J. Yonemoto, C. Tohyama y H. Sone, «Cross-Talk between 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and Testosterone Signal Transduction Pathways in LNCaP Prostate Cancer Cells,» en, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 256, n.º 3, págs. 462-468, mar. de 1999.
- [157] A. Koliopanos, J. Kleeff, Y. Xiao y col., «Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer,» eng, *Oncogene*, vol. 21, n.º 39, págs. 6059-6070, sep. de 2002.
- [158] N. L. Ge y C. J. Elferink, «A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, n.º 35, págs. 22 708-22 713, ago. de 1998.
- [159] T. Hayashibara, Y. Yamada, N. Mori y col., «Possible involvement of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult T-cell leukemia (ATL) leukemogenesis: constitutive activation of AhR in ATL,» en, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 300, n.º 1, págs. 128-134, ene. de 2003.
- [160] T. Ito, S.-I. Tsukumo, N. Suzuki y col., «A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, n.º 24, págs. 25 204-25 210, jun. de 2004.
- [161] O. Moennikes, S. Loeppen, A. Buchmann y col., «A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice,» eng, *Cancer Research*, vol. 64, n.º 14, págs. 4707-4710, jul. de 2004.

- [162] S. Mulero-Navarro, J. Carvajal-Gonzalez, M. Herranz y col., «The dioxin receptor is silenced by promoter hypermethylation in human acute lymphoblastic leukemia through inhibition of Sp1 binding,» *Carcinogenesis*, vol. 27, n.º 5, págs. 1099-1104, mayo de 2006.
- [163] G. Goode, S. Pratap y S. E. Eltom, «Depletion of the Aryl Hydrocarbon Receptor in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells Altered the Expression of Genes in Key Regulatory Pathways of Cancer,» en, *PLOS ONE*, vol. 9, n.º 6, e100103, jun. de 2014.
- [164] N. K. Talari, M. K. Panigrahi, S. Madigubba y P. B. Phanithi, «Overexpression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signalling pathway in human meningioma,» en, *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 137, n.º 2, págs. 241-248, abr. de 2018.
- [165] M. Contador-Troca, A. Alvarez-Barrientos, J. M. Merino y col., «Dioxin receptor regulates aldehyde dehydrogenase to block melanoma tumorigenesis and metastasis,» *Molecular Cancer*, vol. 14, n.º 1, pág. 148, ago. de 2015.
- [166] A. Nacarino-Palma, E. M. Rico-Leo, J. Campisi, A. Ramanathan, J. M. Merino y P. M. Fernández-Salguero, «Aryl Hydrocarbon Receptor Blocks Aging-Induced Senescence in the Liver and Fibroblast Cells,» en, *Cancer Biology*, preprint, feb. de 2021.
- [167] A. Nacarino-Palma, C. M. Rejano-Gordillo, F. J. González-Rico y col., «Loss of Aryl Hydrocarbon Receptor Favors K-RasG12D-Driven Non-Small Cell Lung Cancer,» en, *Cancers*, vol. 13, n.º 16, pág. 4071, ene. de 2021.
- [168] S. C. Darby, D. W. Ewart, P. L. Giangrande y col., «Mortality from liver cancer and liver disease in haemophilic men and boys in UK given blood products contaminated with hepatitis C,» en, *The Lancet*, vol. 350, n.º 9089, págs. 1425-1431, nov. de 1997.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [169] Y. Yu, J. Ping, H. Chen y col., «A comparative analysis of liver transcriptome suggests divergent liver function among human, mouse and rat,» en, *Genomics*, vol. 96, n.º 5, págs. 281-289, nov. de 2010.
- [170] C. Couinaud, *Le foie; Études anatomiques et chirurgicales*. French. Paris: Masson, 1957.
- [171] N. A. Goldsmith y R. T. Woodburne, «The surgical anatomy pertaining to liver resection,» eng, *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, vol. 105, n.º 3, págs. 310-318, sep. de 1957.
- [172] S. M. Strasberg, J. Belghiti, P. A. Clavien y col., «The Brisbane 2000 Terminology of Liver Anatomy and Resections,» en, *HPB*, vol. 2, n.º 3, págs. 333-339, ene. de 2000.
- [173] C. Manterola, M. del Sol, N. Ottone y T. Otzen, «Anatomía Quirúrgica y Radiológica del Hígado. Fundamentos para las Resecciones Hepáticas,» es, *International Journal of Morphology*, vol. 35, n.º 4, págs. 1525-1539, dic. de 2017.
- [174] G. Higgins, R. Anderson, G. Higgins y R. Anderson, *Experimental pathology of liver: restoration of liver in white rat following partial surgical removal*, en, 1931.
- [175] H. Waynforth y P. Flecknell, «Experimental and Surgical Technique In the Rat,» *Psicothema*, ISSN 0214-9915, Vol. 7, N.º. 2, 1995, pags. 452-453, ene. de 1995.
- [176] A. B. Rogers y R. Z. Dintzis, «13 - Hepatobiliary System,» en, en *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*, P. M. Treuting, S. M. Dintzis y K. S. Montine, eds., San Diego: Academic Press, ene. de 2018, págs. 229-239.
- [177] J. E. Hall y A. C. Guyton, *Guyton and Hall textbook of medical physiology*, en, 12th ed. Philadelphia, Pa: Saunders/Elsevier, 2011.
- [178] B. A. Delgado Coello, *Avances en el estudio experimental de la Bioquímica Hepática*. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 2017.



- [179] M. Krishna, «Anatomía microscópica del hígado: Clinical Liver Disease, Vol. 2, No. S1, March 2013 *Recurso de enseñanza oficial de la AASLD*,» es, *Clinical Liver Disease*, vol. 2, n.º S5, págs. 109-112, nov. de 2013.
- [180] G. P. Lahvis, R. W. Pyzalski, E. Glover, H. C. Pitot, M. K. McElwee y C. A. Bradfield, «The aryl hydrocarbon receptor is required for developmental closure of the ductus venosus in the neonatal mouse,» eng, *Molecular Pharmacology*, vol. 67, n.º 3, págs. 714-720, mar. de 2005.
- [181] E. B. Harstad, C. A. Guite, T. L. Thomae y C. A. Bradfield, «Liver deformation in Ahr-null mice: evidence for aberrant hepatic perfusion in early development,» eng, *Molecular Pharmacology*, vol. 69, n.º 5, págs. 1534-1541, mayo de 2006.
- [182] n. Peterson, n. Hodgson, n. Fernandez-Salguero, n. Neumeister y n. Gonzalez, «Hepatic fibrosis and cytochrome P450: experimental models of fibrosis compared to AHR knockout mice,» eng, *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, vol. 17, n.º 2, págs. 112-125, mayo de 2000.
- [183] B. Santiago-Josefat, S. Mulero-Navarro, S. L. Dallas y P. M. Fernandez-Salguero, «Overexpression of latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 1 (LTBP-1) in dioxin receptor-null mouse embryo fibroblasts,» *Journal of Cell Science*, vol. 117, n.º 6, págs. 849-859, feb. de 2004.
- [184] S. Celton-Morizur y C. Desdouets, «Polyploidization of liver cells,» en, en *Polyploidization and Cancer*, ép. Advances in Experimental Medicine and Biology, R. Y. C. Poon, ed., New York, NY: Springer, 2010, págs. 123-135.
- [185] G. Gentric y C. Desdouets, «Polyploidization in Liver Tissue,» en, *The American Journal of Pathology*, vol. 184, n.º 2, págs. 322-331, feb. de 2014.
- [186] S. H. Sigal, P. Rajvanshi, G. R. Gorla y col., «Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events,» *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 276, n.º 5, G1260-G1272, mayo de 1999.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [187] M. Contador-Troca, A. Alvarez-Barrientos, E. Barrasa y col., «The dioxin receptor has tumor suppressor activity in melanoma growth and metastasis,» *Carcinogenesis*, vol. 34, n.º 12, págs. 2683-2693, dic. de 2013.
- [188] C. Esser y A. Rannug, «The Aryl Hydrocarbon Receptor in Barrier Organ Physiology, Immunology, and Toxicology,» en, *Pharmacological Reviews*, vol. 67, n.º 2, págs. 259-279, abr. de 2015.
- [189] C.-I. Ko, Y. Fan, M. d. Gannes, Q. Wang, Y. Xia y A. Puga, «Repression of the Aryl Hydrocarbon Receptor Is Required to Maintain Mitotic Progression and Prevent Loss of Pluripotency of Embryonic Stem Cells,» en, *STEM CELLS*, vol. 34, n.º 12, págs. 2825-2839, 2016.
- [190] M. A. Sartor, M. Schnekenburger, J. L. Marlowe y col., «Genomewide Analysis of Aryl Hydrocarbon Receptor Binding Targets Reveals an Extensive Array of Gene Clusters that Control Morphogenetic and Developmental Programs,» *Environmental Health Perspectives*, vol. 117, n.º 7, págs. 1139-1146, jul. de 2009.
- [191] Y. Fan, G. P. Boivin, E. S. Knudsen, D. W. Nebert, Y. Xia y A. Puga, «The Aryl Hydrocarbon Receptor Functions as a Tumor Suppressor of Liver Carcinogenesis,» en, *Cancer Research*, vol. 70, n.º 1, págs. 212-220, ene. de 2010.
- [192] A. C. de Tomaso Portaz, G. R. Caimi, M. Sánchez y col., «Hexachlorobenzene induces cell proliferation, and aryl hydrocarbon receptor expression (AhR) in rat liver preneoplastic foci, and in the human hepatoma cell line HepG2. AhR is a mediator of ERK1/2 signaling, and cell cycle regulation in HCB-treated HepG2 cells,» en, *Toxicology*, vol. 336, págs. 36-47, oct. de 2015.
- [193] D. P. Jackson, H. Li, K. A. Mitchell, A. D. Joshi y C. J. Elferink, «Ah Receptor-Mediated Suppression of Liver Regeneration through NC-XRE-Driven p21<sup>Cip1</sup> Expression,» en, *Molecular Pharmacology*, vol. 85, n.º 4, págs. 533-541, abr. de 2014.

- [194] K. A. Mitchell, C. A. Lockhart, G. Huang y C. J. Elferink, «Sustained Aryl Hydrocarbon Receptor Activity Attenuates Liver Regeneration,» en, *Molecular Pharmacology*, vol. 70, n.º 1, págs. 163-170, jul. de 2006.
- [195] J. A. Goldman y K. D. Poss, «Gene regulatory programmes of tissue regeneration,» en, *Nature Reviews Genetics*, vol. 21, n.º 9, págs. 511-525, sep. de 2020.
- [196] K. D. Poss, «Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals,» *Nature reviews. Genetics*, vol. 11, n.º 10, págs. 710-722, oct. de 2010.
- [197] M. H. Mokalled y K. D. Poss, «A Regeneration Toolkit,» eng, *Developmental Cell*, vol. 47, n.º 3, págs. 267-280, nov. de 2018.
- [198] S. Rafii, J. M. Butler y B.-S. Ding, «Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells,» en, *Nature*, vol. 529, n.º 7586, págs. 316-325, ene. de 2016.
- [199] J. M. Wells y F. M. Watt, «Diverse mechanisms for endogenous regeneration and repair in mammalian organs,» eng, *Nature*, vol. 557, n.º 7705, págs. 322-328, mayo de 2018.
- [200] M. N. Woszczyzna y T. A. Rando, «A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration,» eng, *Developmental Cell*, vol. 46, n.º 2, págs. 135-143, jul. de 2018.
- [201] C. G. Child, D. Barr, G. R. Holswade y C. S. Harrison, «Liver regeneration following portacaval transposition in dogs,» eng, *Annals of Surgery*, vol. 138, n.º 4, págs. 600-608, oct. de 1953.
- [202] T. E. Starzl, A. Francavilla, C. G. Halgrimson y col., «The origin, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal venous blood,» eng, *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, vol. 137, n.º 2, págs. 179-199, ago. de 1973.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [203] T. E. Starzl, K. A. Porter y C. W. Putnam, «Insulin, glucagon, and the control of hepatic structure, function, and capacity for regeneration,» eng, *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 25, n.º 11 Suppl 1, págs. 1429-1434, nov. de 1976.
- [204] F. G. Court, S. A. Wemyss-Holden, C. P. Morrison y col., «Segmental nature of the porcine liver and its potential as a model for experimental partial hepatectomy,» eng, *The British Journal of Surgery*, vol. 90, n.º 4, págs. 440-444, abr. de 2003.
- [205] N. Fausto, «Liver regeneration and repair: Hepatocytes, progenitor cells, and stem cells,» en, *Hepatology*, vol. 39, n.º 6, págs. 1477-1487, 2004.
- [206] G. K. Michalopoulos, «Liver Regeneration after Partial Hepatectomy,» en, *The American Journal of Pathology*, vol. 176, n.º 1, págs. 2-13, ene. de 2010.
- [207] G. K. Michalopoulos, «Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance,» eng, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 65, n.º 4, págs. 1384-1392, abr. de 2017.
- [208] C. Pfefferli y A. Jaźwińska, «The art of fin regeneration in zebrafish,» *Regeneration*, vol. 2, n.º 2, págs. 72-83, 2015.
- [209] J. López-Luque e I. Fabregat, «Revisiting the liver: from development to regeneration - what we ought to know!» en, *The International Journal of Developmental Biology*, vol. 62, n.º 6-7-8, págs. 441-451, 2018.
- [210] D. E. Cressman, L. E. Greenbaum, R. A. DeAngelis y col., «Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice,» eng, *Science (New York, N.Y.)*, vol. 274, n.º 5291, págs. 1379-1383, nov. de 1996.
- [211] J. A. Cienfuegos, F. Rotellar, J. Baixauli, F. Martínez-Regueira, F. Pardo y J. L. Hernández-Lizoáin, «Liver regeneration—the best kept secret. A model of tissue injury response,» eng, *Revista española de enfermedades digestivas*, vol. 106, n.º 3, págs. 171-194, mar. de 2014.

- [212] K. J. Riehle, Y. Y. Dan, J. S. Campbell y N. Fausto, «New concepts in liver regeneration,» en, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 26, n.º s1, págs. 203-212, 2011.
- [213] Y. Yamada y N. Fausto, «Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor.,» *The American Journal of Pathology*, vol. 152, n.º 6, págs. 1577-1589, jun. de 1998.
- [214] A. D'Espessailles, C. Dossi, G. Intriago, P. Leiva y P. Romanque, «Hormonal pretreatment preserves liver regenerative capacity and minimizes inflammation after partial hepatectomy,» eng, *Annals of Hepatology*, vol. 12, n.º 6, págs. 881-891, dic. de 2013.
- [215] N. L. Bucher y M. N. Swaffield, «THE RATE OF INCORPORATION OF LABELED THYMIDINE INTO THE DEOXYRIBONUCLEIC ACID OF REGENERATING RAT LIVER IN RELATION TO THE AMOUNT OF LIVER EXCISED,» eng, *Cancer Research*, vol. 24, págs. 1611-1625, oct. de 1964.
- [216] C Eipel, K Abshagen y B Vollmar, «Small-for-size. Experimental findings for liver surgery,» *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizen*, vol. 83, págs. 238-46, oct. de 2011.
- [217] G. K. Michalopoulos y M. C. DeFrances, «Liver regeneration,» eng, *Science (New York, N.Y.)*, vol. 276, n.º 5309, págs. 60-66, abr. de 1997.
- [218] N. Fausto, «Multifunctional roles for transforming growth factor-beta 1,» eng, *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, vol. 65, n.º 5, págs. 497-499, nov. de 1991.
- [219] J. M. Schoen y W. W. Lautt, «iNOS is not involved in shear stress-induced nitric oxide release, which triggers the liver regeneration cascade,» eng, *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, vol. 44, págs. 181-182, 2001.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [220] S. Hortelano, M. Zeini, M. Casado, P. Martín-Sanz y L. Boscá, «Animal models for the study of liver regeneration: role of nitric oxide and prostaglandins,» eng, *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, vol. 12, págs. 13-21, ene. de 2007.
- [221] M. Martínez-Cayueta, «Oxygen free radicals and human disease,» eng, *Biochimie*, vol. 77, n.º 3, págs. 147-161, 1995.
- [222] A. Brinkmann, N. Katz, D. Sasse y K. Jungermann, «Increase of the gluconeogenic and decrease of the glycolytic capacity of rat liver with a change of the metabolic zonation after partial hepatectomy,» eng, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*, vol. 359, n.º 11, págs. 1561-1571, nov. de 1978.
- [223] J. Huang y D. A. Rudnick, «Elucidating the Metabolic Regulation of Liver Regeneration,» en, *The American Journal of Pathology*, vol. 184, n.º 2, págs. 309-321, feb. de 2014.
- [224] A. B. Murray, W. Strecker y S. Silz, «Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy, and comparison with biochemical results,» eng, *Journal of Cell Science*, vol. 50, págs. 433-448, ago. de 1981.
- [225] I. L. Csanaky, L. M. Aleksunes, Y. Tanaka y C. D. Klaassen, «Role of hepatic transporters in prevention of bile acid toxicity after partial hepatectomy in mice,» eng, *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 297, n.º 3, G419-433, sep. de 2009.
- [226] M. Liu y P. Chen, «Proliferation-inhibiting pathways in liver regeneration (Review),» eng, *Molecular Medicine Reports*, vol. 16, n.º 1, págs. 23-35, jul. de 2017.
- [227] T. H. Kim, W. M. Mars, D. B. Stolz, B. E. Petersen y G. K. Michalopoulos, «Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat,» eng, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 26, n.º 4, págs. 896-904, oct. de 1997.

- [228] M. Shimizu, A. Hara, M. Okuno y col., «Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis,» eng, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 33, n.º 3, págs. 569-576, mar. de 2001.
- [229] H. Aurich, M. Sgodda, P. Kaltwasser y col., «Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo,» eng, *Gut*, vol. 58, n.º 4, págs. 570-581, abr. de 2009.
- [230] A. Banas, Y. Yamamoto, T. Teratani y T. Ochiya, «Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies,» eng, *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, vol. 236, n.º 12, págs. 3228-3241, dic. de 2007.
- [231] A. W. Duncan, C. Dorrell y M. Grompe, «Stem Cells and Liver Regeneration,» en, *Gastroenterology*, vol. 137, n.º 2, págs. 466-481, ago. de 2009.
- [232] A. Sánchez, V. M. Factor, I. S. Schroeder, P. Nagy y S. S. Thorgeirsson, «Activation of NF-kappaB and STAT3 in rat oval cells during 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration,» eng, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 39, n.º 2, págs. 376-385, feb. de 2004.
- [233] E. Santoni-Rugiu, P. Jernes, S. S. Thorgeirsson y H. C. Bisgaard, «Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion,» eng, *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, vol. 113, n.º 11-12, págs. 876-902, dic. de 2005.
- [234] L. Caja, E. Bertran, J. Campbell, N. Fausto e I. Fabregat, «The transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) mediates acquisition of a mesenchymal stem cell-like phenotype in human liver cells,» eng, *Journal of Cellular Physiology*, vol. 226, n.º 5, págs. 1214-1223, mayo de 2011.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [235] J. M. Peters, M. G. Narotsky, G. Elizondo, P. M. Fernandez-Salguero, F. J. Gonzalez y B. D. Abbott, «Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice,» eng, *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, vol. 47, n.º 1, págs. 86-92, ene. de 1999.
- [236] N. D. Theise, S. Badve, R. Saxena y col., «Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation,» eng, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 31, n.º 1, págs. 235-240, ene. de 2000.
- [237] W.-H. Liu, L.-N. Ren, T. Wang, N. Navarro-Alvarez y L.-J. Tang, «The Involving Roles of Intrahepatic and Extrahepatic Stem/Progenitor Cells (SPCs) to Liver Regeneration,» eng, *International Journal of Biological Sciences*, vol. 12, n.º 8, págs. 954-963, 2016.
- [238] S. Espejel, G. R. Roll, K. J. McLaughlin y col., «Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes have the functional and proliferative capabilities needed for liver regeneration in mice,» eng, *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, n.º 9, págs. 3120-3126, sep. de 2010.
- [239] P. Sancho-Bru, P. Roelandt, N. Narain y col., «Directed differentiation of murine-induced pluripotent stem cells to functional hepatocyte-like cells,» eng, *Journal of Hepatology*, vol. 54, n.º 1, págs. 98-107, ene. de 2011.
- [240] T. Takebe, K. Sekine, M. Enomura y col., «Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant,» eng, *Nature*, vol. 499, n.º 7459, págs. 481-484, jul. de 2013.
- [241] L. Boulter, O. Govaere, T. G. Bird y col., «Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease,» eng, *Nature Medicine*, vol. 18, n.º 4, págs. 572-579, mar. de 2012.
- [242] U. Apte, M. D. Thompson, S. Cui, B. Liu, B. Cieply y S. P. S. Monga, «Wnt/beta-catenin signaling mediates oval cell response in rodents,» eng, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 47, n.º 1, págs. 288-295, ene. de 2008.



- [243] M. Hu, M. Kurobe, Y. J. Jeong y col., «Wnt/beta-catenin signaling in murine hepatic transit amplifying progenitor cells,» eng, *Gastroenterology*, vol. 133, n.º 5, págs. 1579-1591, nov. de 2007.
- [244] T. Itoh, Y. Kamiya, M. Okabe, M. Tanaka y A. Miyajima, «Inducible expression of Wnt genes during adult hepatic stem/progenitor cell response,» eng, *FEBS letters*, vol. 583, n.º 4, págs. 777-781, feb. de 2009.
- [245] W. Yang, H.-X. Yan, L. Chen y col., «Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells,» eng, *Cancer Research*, vol. 68, n.º 11, págs. 4287-4295, jun. de 2008.
- [246] B. Wang, L. Zhao, M. Fish, C. Y. Logan y R. Nusse, «Self-renewing diploid Axin2(+) cells fuel homeostatic renewal of the liver,» eng, *Nature*, vol. 524, n.º 7564, págs. 180-185, ago. de 2015.
- [247] F.-X. Yu y K.-L. Guan, «The Hippo pathway: regulators and regulations,» eng, *Genes & Development*, vol. 27, n.º 4, págs. 355-371, feb. de 2013.
- [248] M. Nishio, K. Otsubo, T. Maehama, K. Mimori y A. Suzuki, «Capturing the mammalian Hippo: elucidating its role in cancer,» eng, *Cancer Science*, vol. 104, n.º 10, págs. 1271-1277, oct. de 2013.
- [249] N. Nishioka, K.-i. Inoue, K. Adachi y col., «The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass,» eng, *Developmental Cell*, vol. 16, n.º 3, págs. 398-410, mar. de 2009.
- [250] B. Liu, A. W. Bell, S. Paranjpe y col., «Suppression of liver regeneration and hepatocyte proliferation in hepatocyte-targeted glypican 3 transgenic mice,» eng, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 52, n.º 3, págs. 1060-1067, sep. de 2010.
- [251] D. Yimlamai, C. Christodoulou, G. G. Galli y col., «Hippo pathway activity influences liver cell fate,» eng, *Cell*, vol. 157, n.º 6, págs. 1324-1338, jun. de 2014.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [252] K. Takahashi y S. Yamanaka, «Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors,» eng, *Cell*, vol. 126, n.º 4, págs. 663-676, ago. de 2006.
- [253] R. Pohjanvirta, *The AH Receptor in Biology and Toxicology*, en. John Wiley & Sons, nov. de 2011.
- [254] C. Gutiérrez-Vázquez y F. J. Quintana, «Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor,» en, *Immunity*, vol. 48, n.º 1, págs. 19-33, ene. de 2018.
- [255] B. V. Fausett y D. Goldman, «A role for alpha1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina,» eng, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 26, n.º 23, págs. 6303-6313, jun. de 2006.
- [256] A. Lepilina, A. N. Coon, K. Kikuchi y col., «A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration,» eng, *Cell*, vol. 127, n.º 3, págs. 607-619, nov. de 2006.
- [257] R. C. Ransom, A. C. Carter, A. Salhotra y col., «Mechanoresponsive stem cells acquire neural crest fate in jaw regeneration,» en, *Nature*, vol. 563, n.º 7732, págs. 514-521, nov. de 2018.
- [258] C.-I. Ko y A. Puga, «Does the aryl hydrocarbon receptor regulate pluripotency?» en, *Current Opinion in Toxicology*, vol. 2, págs. 1-7, feb. de 2017.
- [259] P. F. Y. Cheung, C. K. C. Cheng, N. C. L. Wong y col., «Granulin-epithelin precursor is an oncofetal protein defining hepatic cancer stem cells,» eng, *PloS One*, vol. 6, n.º 12, e28246, 2011.
- [260] A. R. Safa, «Resistance to Cell Death and Its Modulation in Cancer Stem Cells,» eng, *Critical Reviews in Oncogenesis*, vol. 21, n.º 3-4, págs. 203-219, 2016.

- [261] R. T. Wagner, X. Xu, F. Yi, B. J. Merrill y A. J. Cooney, «Canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin Regulation of Liver Receptor Homolog-1 Mediates Pluripotency Gene Expression,» *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, vol. 28, n.º 10, págs. 1794-1804, oct. de 2010.
- [262] L. Gadye, D. Das, M. A. Sanchez y col., «Injury Activates Transient Olfactory Stem Cell States with Diverse Lineage Capacities,» eng, *Cell Stem Cell*, vol. 21, n.º 6, 775-790.e9, dic. de 2017.
- [263] M. Rocha-Martins, B. C. de Toledo, P. L. Santos-França y col., «De novo genesis of retinal ganglion cells by targeted expression of Klf4 in vivo,» eng, *Development (Cambridge, England)*, vol. 146, n.º 16, ago. de 2019.
- [264] Q. Wang, H. Kurita, V. Carreira y col., «Ah Receptor Activation by Dioxin Disrupts Activin, BMP, and WNT Signals During the Early Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells and Inhibits Cardiomyocyte Functions,» eng, *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, vol. 149, n.º 2, págs. 346-357, feb. de 2016.
- [265] K. Sharan, J. S. Mishra, G. Swarnkar y col., «A novel quercetin analogue from a medicinal plant promotes peak bone mass achievement and bone healing after injury and exerts an anabolic effect on osteoporotic bone: The role of aryl hydrocarbon receptor as a mediator of osteogenic action,» en, *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 26, n.º 9, págs. 2096-2111, 2011.
- [266] H. Yu, Y. Du, X. Zhang y col., «The aryl hydrocarbon receptor suppresses osteoblast proliferation and differentiation through the activation of the ERK signaling pathway,» eng, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 280, n.º 3, págs. 502-510, nov. de 2014.
- [267] M. Korkalainen, E. Kallio, A. Olkku y col., «Dioxins interfere with differentiation of osteoblasts and osteoclasts,» eng, *Bone*, vol. 44, n.º 6, págs. 1134-1142, jun. de 2009.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [268] F. L. Casado, K. P. Singh y T. A. Gasiewicz, «Aryl hydrocarbon receptor activation in hematopoietic stem/progenitor cells alters cell function and pathway-specific gene modulation reflecting changes in cellular trafficking and migration,» eng, *Molecular Pharmacology*, vol. 80, n.º 4, págs. 673-682, oct. de 2011.
- [269] R. Sakai, T. Kajiume, H. Inoue y col., «TCDD treatment eliminates the long-term reconstitution activity of hematopoietic stem cells,» eng, *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, vol. 72, n.º 1, págs. 84-91, mar. de 2003.
- [270] K. P. Singh, R. W. Garrett, F. L. Casado y T. A. Gasiewicz, «Aryl hydrocarbon receptor-null allele mice have hematopoietic stem/progenitor cells with abnormal characteristics and functions,» eng, *Stem Cells and Development*, vol. 20, n.º 5, págs. 769-784, mayo de 2011.
- [271] J. Procházková, M. Kabátková, V. Bryja y col., «The Interplay of the Aryl Hydrocarbon Receptor and  $\beta$ -Catenin Alters Both AhR-Dependent Transcription and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Liver Progenitors,» en, *Toxicological Sciences*, vol. 122, n.º 2, págs. 349-360, ago. de 2011.
- [272] J. J. Reiners Jr, R. Clift y P. Mathieu, «Suppression of cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor,» *Carcinogenesis*, vol. 20, n.º 8, págs. 1561-1566, ago. de 1999.
- [273] R. P. Santini, S. Myrand, C. Elferink y J. J. Reiners, «Regulation of Cyp1a1 induction by dioxin as a function of cell cycle phase,» eng, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 299, n.º 2, págs. 718-728, nov. de 2001.
- [274] F. J. Wiebel, U. Klose y F. Kiefer, «Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vitro: H4IIEC3-derived 5L hepatoma cells as a model system,» eng, *Toxicology Letters*, vol. 55, n.º 2, págs. 161-169, feb. de 1991.
- [275] V. Trapani, V. Patel, C.-O. Leong y col., «DNA damage and cell cycle arrest induced by 2-(4-amino-3-methylphenyl)-5-fluorobenzothiazole (5F 203, NSC 703786) is attenuated in aryl hydrocarbon receptor deficient

- MCF-7 cells,» en, *British Journal of Cancer*, vol. 88, n.º 4, págs. 599-605, feb. de 2003.
- [276] A. Levine-Fridman, L. Chen y C. J. Elferink, «Cytochrome P4501A1 Promotes G<sub>1</sub> Phase Cell Cycle Progression by Controlling Aryl Hydrocarbon Receptor Activity,» en, *Molecular Pharmacology*, vol. 65, n.º 2, págs. 461-469, feb. de 2004.
- [277] H. M. Chan, L. Smith y N. B. La Thangue, «Role of LXCXE motif-dependent interactions in the activity of the retinoblastoma protein,» en, *Oncogene*, vol. 20, n.º 43, págs. 6152-6163, sep. de 2001.
- [278] A. Puga, S. J. Barnes, T. P. Dalton, C. y Chang, E. S. Knudsen y M. A. Maier, «Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n.º 4, págs. 2943-2950, ene. de 2000.
- [279] J. L. Marlowe y A. Puga, «Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis,» en, *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 96, n.º 6, págs. 1174-1184, dic. de 2005.
- [280] J. W. Bauman, T. L. Goldsworthy, C. S. Dunn y T. R. Fox, «Inhibitory effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on rat hepatocyte proliferation induced by 2/3 partial hepatectomy,» eng, *Cell Proliferation*, vol. 28, n.º 8, págs. 437-451, ago. de 1995.
- [281] R. Park, S. Madhavaram y J. D. Ji, «The Role of Aryl-Hydrocarbon Receptor (AhR) in Osteoclast Differentiation and Function,» en, *Cells*, vol. 9, n.º 10, pág. 2294, oct. de 2020.
- [282] C. Yun, K. Katchko, M. Schallmo y col., «Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists Mitigate the Effects of Dioxin on Critical Cellular Functions in Differentiating Human Osteoblast-Like Cells,» en, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, n.º 1, pág. 225, ene. de 2018.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [283] P. Hofsteen, V. Mehta, M.-S. Kim, R. E. Peterson y W. Heideman, «TCDD Inhibits Heart Regeneration in Adult Zebrafish,» en, *Toxicological Sciences*, vol. 132, n.º 1, págs. 211-221, mar. de 2013.
- [284] R. Di Giaimo, T. Durovic, P. Barquin y col., «The Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway Defines the Time Frame for Restorative Neurogenesis,» en, *Cell Reports*, vol. 25, n.º 12, 3241-3251.e5, dic. de 2018.
- [285] E. A. Andreasen, L. K. Mathew, C. V. Löhr, R. Hasson y R. L. Tanguay, «Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Impairs Extracellular Matrix Remodeling during Zebra Fish fin Regeneration,» en, *Toxicological Sciences*, vol. 95, n.º 1, págs. 215-226, ene. de 2007.
- [286] L. K. Mathew, E. A. Andreasen y R. L. Tanguay, «Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Inhibits Regenerative Growth,» en, *Molecular Pharmacology*, vol. 69, n.º 1, págs. 257-265, ene. de 2006.
- [287] L. K. Mathew, M. T. Simonich y R. L. Tanguay, «AHR-dependent misregulation of Wnt signaling disrupts tissue regeneration,» *Biochemical pharmacology*, vol. 77, n.º 4, págs. 498-507, feb. de 2009.
- [288] J. M. Zodrow y R. L. Tanguay, «2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits zebrafish caudal fin regeneration,» eng, *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, vol. 76, n.º 1, págs. 151-161, nov. de 2003.
- [289] C.-H. Kim, «Hidden secret in hepatitis B viral X protein mutation and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in hepatocarcinoma cancer,» eng, *Hepatology Surgery and Nutrition*, vol. 3, n.º 3, págs. 115-117, jun. de 2014.
- [290] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre y A. Jemal, «Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,» eng, *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 68, n.º 6, págs. 394-424, nov. de 2018.
- [291] K. A. McGlynn, J. L. Petrick y H. B. El-Serag, «Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma,» *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 73, n.º Suppl 1, págs. 4-13, ene. de 2021.

- [292] J. Ferlay, H.-R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers y D. M. Parkin, «Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008,» eng, *International Journal of Cancer*, vol. 127, n.º 12, págs. 2893-2917, dic. de 2010.
- [293] J. M. Llovet, S. Ricci, V. Mazzaferro y col., «Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma,» eng, *The New England Journal of Medicine*, vol. 359, n.º 4, págs. 378-390, jul. de 2008.
- [294] M. Matias, M. Casa-Nova, M. Faria y col., «Prognostic Factors after Liver Resection for Colorectal Liver Metastasis,» eng, *Acta Medica Portuguesa*, vol. 28, n.º 3, págs. 357-369, jun. de 2015.
- [295] V. M. Zaydfudim, T. L. McMurry, A. M. Harrigan y col., «Improving treatment and survival: a population-based study of current outcomes after a hepatic resection in patients with metastatic colorectal cancer,» eng, *HPB: the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, vol. 17, n.º 11, págs. 1019-1024, nov. de 2015.
- [296] D. Palmes y H.-U. Spiegel, «Animal models of liver regeneration,» eng, *Biomaterials*, vol. 25, n.º 9, págs. 1601-1611, abr. de 2004.
- [297] J. V. Schmidt, G. H. Su, J. K. Reddy, M. C. Simon y C. A. Bradfield, «Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development,» eng, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, n.º 13, págs. 6731-6736, jun. de 1996.
- [298] N. Fausto, J. S. Campbell y K. J. Riehle, «Liver regeneration,» eng, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 43, n.º 2 Suppl 1, S45-53, feb. de 2006.
- [299] S. N. Naryzhny y H. Lee, «Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer,» eng, *FEBS letters*, vol. 584, n.º 20, págs. 4292-4298, oct. de 2010.
- [300] D. Ohayon, A. De Chiara, N. Chapuis y col., «Cytoplasmic proliferating cell nuclear antigen connects glycolysis and cell survival in acute myeloid leukemia,» eng, *Scientific Reports*, vol. 6, pág. 35 561, oct. de 2016.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [301] S. Kurinna, S. A. Stratton, Z. Coban y col., «p53 regulates a mitotic transcription program and determines ploidy in normal mouse liver,» eng, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 57, n.º 5, págs. 2004-2013, mayo de 2013.
- [302] H. Gilgenkrantz y A. Collin de l'Hortet, «New insights into liver regeneration,» eng, *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, vol. 35, n.º 10, págs. 623-629, oct. de 2011.
- [303] J.-H. Shi y P.-D. Line, «Hallmarks of postoperative liver regeneration: An updated insight on the regulatory mechanisms,» en, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 35, n.º 6, págs. 960-966, jun. de 2020.
- [304] Y. Malato, L. E. Sander, C. Liedtke y col., «Hepatocyte-specific inhibitor-of-kappaB-kinase deletion triggers the innate immune response and promotes earlier cell proliferation during liver regeneration,» eng, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 47, n.º 6, págs. 2036-2050, jun. de 2008.
- [305] K. Terui y M. Ozaki, «The role of STAT3 in liver regeneration,» eng, *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)*, vol. 41, n.º 7, págs. 461-469, jul. de 2005.
- [306] T. Moroishi, T. Hayashi, W.-W. Pan y col., «The Hippo Pathway Kinases LATS1/2 Suppress Cancer Immunity,» eng, *Cell*, vol. 167, n.º 6, págs. 1525-1539.e17, dic. de 2016.
- [307] D. Yimlamai, B. H. Fowl y F. D. Camargo, «Emerging evidence on the role of the Hippo/YAP pathway in liver physiology and cancer,» eng, *Journal of Hepatology*, vol. 63, n.º 6, págs. 1491-1501, dic. de 2015.
- [308] M. J. Perugorria, P. Olaizola, I. Labiano y col., «Wnt- $\beta$ -catenin signalling in liver development, health and disease,» eng, *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, vol. 16, n.º 2, págs. 121-136, feb. de 2019.
- [309] J. O. Russell y S. P. Monga, «Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Liver Development, Homeostasis, and Pathobiology,» eng, *Annual Review of Pathology*, vol. 13, págs. 351-378, ene. de 2018.



- [310] S. Crumm, M. Cofan, E. Juskeviciute y J. B. Hoek, «Adenine nucleotide changes in the remnant liver: An early signal for regeneration after partial hepatectomy,» en, *Hepatology*, vol. 48, n.º 3, págs. 898-908, 2008.
- [311] E. Kachaylo, C. Tschuor, N. Calo y col., «PTEN Down-Regulation Promotes  $\beta$ -Oxidation to Fuel Hypertrophic Liver Growth After Hepatectomy in Mice,» eng, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 66, n.º 3, págs. 908-921, sep. de 2017.
- [312] P. Seyer, D. Vallois, C. Poitry-Yamate y col., «Hepatic glucose sensing is required to preserve  $\beta$  cell glucose competence,» eng, *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, n.º 4, págs. 1662-1676, abr. de 2013.
- [313] M. Arai, O. Yokosuka, T. Chiba y col., «Gene expression profiling reveals the mechanism and pathophysiology of mouse liver regeneration,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n.º 32, págs. 29 813-29 818, ago. de 2003.
- [314] R. J. Bonney, P. R. Walker y V. R. Potter, «Isoenzyme patterns in parenchymal and non-parenchymal cells isolated from regenerating and regenerated rat liver,» *Biochemical Journal*, vol. 136, n.º 4, págs. 947-954, dic. de 1973.
- [315] G. K. Michalopoulos y Z. Khan, «Liver Stem Cells: Experimental Findings and Implications for Human Liver Disease,» eng, *Gastroenterology*, vol. 149, n.º 4, págs. 876-882, oct. de 2015.
- [316] G. Dai, L. He, P. Bu e Y.-J. Y. Wan, «Pregnane X receptor is essential for normal progression of liver regeneration,» en, *Hepatology*, vol. 47, n.º 4, págs. 1277-1287, dic. de 2007.
- [317] M. Laplante y D. M. Sabatini, «mTOR signaling in growth control and disease,» eng, *Cell*, vol. 149, n.º 2, págs. 274-293, abr. de 2012.
- [318] J. S. L. Yu y W. Cui, «Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination,» eng, *Development (Cambridge, England)*, vol. 143, n.º 17, págs. 3050-3060, sep. de 2016.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [319] C. Espeillac, C. Mitchell, S. Celton-Morizur y col., «S6 kinase 1 is required for rapamycin-sensitive liver proliferation after mouse hepatectomy,» eng, *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 121, n.º 7, págs. 2821-2832, jul. de 2011.
- [320] K. Ohashi, «Liver tissue engineering: The future of liver therapeutics,» eng, *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, vol. 38 Suppl 1, S76-87, nov. de 2008.
- [321] K. Ohashi, F. Park y M. A. Kay, «Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application,» eng, *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, vol. 79, n.º 11, págs. 617-630, nov. de 2001.
- [322] R. B. Howard y L. A. Pesch, «Respiratory activity of intact, isolated parenchymal cells from rat liver,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 243, n.º 11, págs. 3105-3109, jun. de 1968.
- [323] S. Koenig, H. Aurich, C. Schneider y col., «Zonal expression of hepatocytic marker enzymes during liver repopulation,» eng, *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 128, n.º 2, págs. 105-114, ago. de 2007.
- [324] H. Hamaguchi, Y. Yamaguchi, M. Goto y col., «Hepatic biliary transport after hepatocyte transplantation in Eizai hyperbilirubinemic rats,» eng, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 20, n.º 1 Pt 1, págs. 220-224, jul. de 1994.
- [325] M. Mito, H. Ebata, M. Kusano, T. Onishi, M. Hiratsuka y T. Saito, «Studies on ectopic liver utilizing hepatocyte transplantation into the rat spleen,» eng, *Transplantation Proceedings*, vol. 11, n.º 1, págs. 585-591, mar. de 1979.
- [326] R. Taub, «Liver regeneration: from myth to mechanism,» en, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 5, n.º 10, págs. 836-847, oct. de 2004.
- [327] A. Karimian, Y. Ahmadi y B. Yousefi, «Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage,» en, *DNA Repair*, vol. 42, págs. 63-71, jun. de 2016.

- [328] A. Prokesch, F. A. Graef, T. Madl y col., «Liver p53 is stabilized upon starvation and required for amino acid catabolism and gluconeogenesis,» eng, *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 31, n.º 2, págs. 732-742, feb. de 2017.
- [329] Y. Aylon y M. Oren, «p53: Guardian of ploidy,» en, *Molecular Oncology, Genetic Instability and Cancer*, vol. 5, n.º 4, págs. 315-323, ago. de 2011.
- [330] A. Besnard, B. Julien, E. Gonzales y T. Tordjmann, «Innate immunity, purinergic system, and liver regeneration: a trip in complexity,» eng, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 57, n.º 5, págs. 1688-1690, mayo de 2013.
- [331] D. W. Kim, L. Gazourian, S. A. Quadri, R. Romieu-Mourez, D. H. Sherr y G. E. Sonenshein, «The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells,» eng, *Oncogene*, vol. 19, n.º 48, págs. 5498-5506, nov. de 2000.
- [332] K.-K. Kuo, K.-T. Lee, K.-K. Chen y col., «Positive Feedback Loop of OCT4 and c-JUN Expedites Cancer Stemness in Liver Cancer,» *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 34, jun. de 2016.
- [333] X. Yin, B.-H. Zhang, S.-S. Zheng y col., «Coexpression of gene Oct4 and Nanog initiates stem cell characteristics in hepatocellular carcinoma and promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of Stat3/Snail signaling,» eng, *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 8, pág. 23, mar. de 2015.
- [334] J.-J. Zhou, R.-F. Chen, X.-G. Deng y col., «Hepatitis C virus core protein regulates NANOG expression via the stat3 pathway,» eng, *FEBS letters*, vol. 588, n.º 4, págs. 566-573, feb. de 2014.
- [335] K.-P. Lee, J.-H. Lee, T.-S. Kim y col., «The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis,» eng, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, n.º 18, págs. 8248-8253, mayo de 2010.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [336] N. Zhang, H. Bai, K. K. David y col., «The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals,» *Developmental cell*, vol. 19, n.º 1, págs. 27-38, jul. de 2010.
- [337] D. Zhou, C. Conrad, F. Xia y col., «Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene,» eng, *Cancer Cell*, vol. 16, n.º 5, págs. 425-438, nov. de 2009.
- [338] M. J. Caldez, M. Bjorklund y P. Kaldis, «Cell cycle regulation in NAFLD: when imbalanced metabolism limits cell division,» en, *Hepatology International*, vol. 14, n.º 4, págs. 463-474, jul. de 2020.
- [339] N. Shyh-Chang, G. Q. Daley y L. C. Cantley, «Stem cell metabolism in tissue development and aging,» eng, *Development (Cambridge, England)*, vol. 140, n.º 12, págs. 2535-2547, jun. de 2013.
- [340] E. A. Abd El-Haleim, A. K. Bahgat y S. Saleh, «Effects of combined PPAR- $\gamma$  and PPAR- $\alpha$  agonist therapy on fructose induced NASH in rats: Modulation of gene expression,» en, *European Journal of Pharmacology*, vol. 773, págs. 59-70, feb. de 2016.
- [341] C.-H. Lee, A. Chawla, N. Urbiztondo y col., «Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta,» eng, *Science (New York, N.Y.)*, vol. 302, n.º 5644, págs. 453-457, oct. de 2003.
- [342] H. Ebata, M. Kusano, T. Onishi, T. Saito y M. Mito, «Liver regeneration utilizing isolated hepatocytes transplanted into the rat spleen,» eng, *Surgical Forum*, vol. 29, págs. 338-340, 1978.
- [343] K. J. Hillan, A. D. Burt, W. D. George, R. N. MacSween, M. R. Griffiths y J. A. Bradley, «Intrasplenic hepatocyte transplantation in rats with experimental liver injury: morphological and morphometric studies,» eng, *The Journal of Pathology*, vol. 159, n.º 1, págs. 67-73, sep. de 1989.
- [344] K. Kato, K. Onodera, M. Sawa y col., «Effect of Hepatocyte Growth Factor on the Proliferation of Intrasplenically Transplanted Hepatocytes in Rats,»

- en, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 222, n.º 1, págs. 101-106, mayo de 1996.
- [345] N. Kobayashi, M. Ito, J. Nakamura y col., «Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis,» en, *Hepatology*, vol. 31, n.º 4, págs. 851-857, 2000.
- [346] J. M. Benito, V. Cuervas-Mons Martínez, A. Colas, M. Diaz y J. M. Segovia de Arana, «Allotransplantation of hepatocytes into spleen prolongs survival and improves albumin levels in cirrhotic dogs,» eng, *Transplantation Proceedings*, vol. 21, n.º 3, pág. 3520, jun. de 1989.
- [347] M. Rosenzweig, B. Canque y J. C. Gluckman, «Human dendritic cell differentiation pathway from CD34+ hematopoietic precursor cells,» eng, *Blood*, vol. 87, n.º 2, págs. 535-544, ene. de 1996.
- [348] R. M. Steinman y Z. A. Cohn, «IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE : I. MORPHOLOGY, QUANTITATION, TISSUE DISTRIBUTION,» *Journal of Experimental Medicine*, vol. 137, n.º 5, págs. 1142-1162, mayo de 1973.
- [349] M. C. Nussenzweig, R. M. Steinman, B. Gutchinov y Z. A. Cohn, «Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes.,» en, *Journal of Experimental Medicine*, vol. 152, n.º 4, págs. 1070-1084, oct. de 1980.
- [350] R. M. Steinman, G. Kaplan, M. D. Witmer y Z. A. Cohn, «Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro,» eng, *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 149, n.º 1, págs. 1-16, ene. de 1979.
- [351] A. K. Abbas, A. K. Abbas, A. H. Lichtman, A. H. Lichtman, J. S. Pober y J. S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*, en. Saunders, 1997.
- [352] J. M. Austyn y K. J. Wood, «Principles of cellular and molecular immunology,» English, Oxford University Press, inf. téc., 1993.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [353] C. A. J. Jr, P. Travers, M. Walport y col., *Immunobiology*, 5th. Garland Science, 2001.
- [354] M. Bogunovic, F. Ginhoux, J. Helft y col., «Origin of the lamina propria dendritic cell network,» eng, *Immunity*, vol. 31, n.º 3, págs. 513-525, sep. de 2009.
- [355] F. Ginhoux, K. Liu, J. Helft y col., «The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs,» eng, *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, n.º 13, págs. 3115-3130, dic. de 2009.
- [356] K. Liu, G. D. Victora, T. A. Schwickert y col., «In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis,» eng, *Science (New York, N.Y.)*, vol. 324, n.º 5925, págs. 392-397, abr. de 2009.
- [357] S. H. Naik, P. Sathe, H.-Y. Park y col., «Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo,» eng, *Nature Immunology*, vol. 8, n.º 11, págs. 1217-1226, nov. de 2007.
- [358] N. Onai, A. Obata-Onai, M. A. Schmid, T. Ohteki, D. Jarrossay y M. G. Manz, «Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow,» eng, *Nature Immunology*, vol. 8, n.º 11, págs. 1207-1216, nov. de 2007.
- [359] M. M. Meredith, K. Liu, G. Darrasse-Jeze y col., «Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage,» eng, *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 209, n.º 6, págs. 1153-1165, jun. de 2012.
- [360] R. Blecher-Gonen, P. Bost, K. L. Hilligan y col., «Single-Cell Analysis of Diverse Pathogen Responses Defines a Molecular Roadmap for Generating Antigen-Specific Immunity,» en, *Cell Systems*, vol. 8, n.º 2, 109-121.e6, feb. de 2019.
- [361] M. Merad, P. Sathe, J. Helft, J. Miller y A. Mortha, «The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in

- the Steady State and the Inflamed Setting,» *Annual Review of Immunology*, vol. 31, n.º 1, págs. 563-604, 2013.
- [362] N. van Panhuys, «TCR Signal Strength Alters T–DC Activation and Interaction Times and Directs the Outcome of Differentiation,» *Frontiers in Immunology*, vol. 7, 2016.
- [363] M. Boucard-Jourdin, D. Kugler, M.-L. E. Ahanda y col., « $\beta$ 8 Integrin Expression and Activation of TGF- $\beta$  by Intestinal Dendritic Cells Are Determined by Both Tissue Microenvironment and Cell Lineage,» en, *The Journal of Immunology*, vol. 197, n.º 5, págs. 1968-1978, sep. de 2016.
- [364] D. Esterházy, M. C. C. Canesso, L. Mesin y col., «Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses,» en, *Nature*, vol. 569, n.º 7754, págs. 126-130, mayo de 2019.
- [365] K. L. Hilligan y F. Ronchese, «Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses,» *Cellular and Molecular Immunology*, vol. 17, n.º 6, págs. 587-599, jun. de 2020.
- [366] K. Enjyoji, J. Sévigny, Y. Lin y col., «Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation,» eng, *Nature Medicine*, vol. 5, n.º 9, págs. 1010-1017, sep. de 1999.
- [367] S. Huang, S. Apasov, M. Koshiba y M. Sitkovsky, «Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion,» eng, *Blood*, vol. 90, n.º 4, págs. 1600-1610, ago. de 1997.
- [368] S. W. Jackson, T. Hoshi, Y. Wu y col., «Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice,» eng, *The American Journal of Pathology*, vol. 171, n.º 4, págs. 1395-1404, oct. de 2007.
- [369] E. Kaczmarek, K. Koziak, J. Sévigny y col., «Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase,» eng, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, n.º 51, págs. 33 116-33 122, dic. de 1996.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [370] A. Ohta, E. Gorelik, S. J. Prasad y col., «A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells,» eng, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, n.º 35, págs. 13 132-13 137, ago. de 2006.
- [371] A. Ohta y M. Sitkovsky, «Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage,» en, *Nature*, vol. 414, n.º 6866, págs. 916-920, dic. de 2001.
- [372] G. Wolberg, T. P. Zimmerman, K. Hiemstra, M. Winston y L. C. Chu, «Adenosine inhibition of lymphocyte-mediated cytotoxicity: possible role of cyclic adenosine monophosphate,» eng, *Science (New York, N.Y.)*, vol. 187, n.º 4180, págs. 957-959, mar. de 1975.
- [373] M. Dosch, J. Gerber, F. Jebbawi y G. Beldi, «Mechanisms of ATP Release by Inflammatory Cells,» en, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, n.º 4, pág. 1222, abr. de 2018.
- [374] N. Mizumoto, T. Kumamoto, S. C. Robson y col., «CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness,» en, *Nature Medicine*, vol. 8, n.º 4, págs. 358-365, abr. de 2002.
- [375] M. Romio, B. Reinbeck, S. Bongardt, S. Hüls, S. Burghoff y J. Schrader, «Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and T<sub>H</sub>17 cells,» *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 301, n.º 2, págs. C530-C539, ago. de 2011.
- [376] T. Woehrle, L. Yip, A. Elkhali y col., «Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse,» *Blood*, vol. 116, n.º 18, págs. 3475-3484, nov. de 2010.
- [377] L. Yip, T. Woehrle, R. Corriden y col., «Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors,» en, *The FASEB Journal*, vol. 23, n.º 6, págs. 1685-1693, 2009.



- [378] I. D. Maccanfroni, M. C. Takenaka, A. Yeste y col., «Metabolic control of type 1 regulatory (Tr1) cell differentiation by AHR and HIF1- $\alpha$ ,» *Nature medicine*, vol. 21, n.º 6, págs. 638-646, jun. de 2015.
- [379] U. Schenk, M. Frascoli, M. Proietti y col., «ATP Inhibits the Generation and Function of Regulatory T Cells Through the Activation of Purinergic P2X Receptors,» EN, *Science Signaling*, mar. de 2011.
- [380] M. C. Takenaka, S. Robson y F. J. Quintana, «Regulation of the T Cell Response by CD39,» eng, *Trends in Immunology*, vol. 37, n.º 7, págs. 427-439, jul. de 2016.
- [381] J. Amores-Iniesta, M. Barberà-Cremades, C. M. Martínez y col., «Extracellular ATP Activates the NLRP3 Inflammasome and Is an Early Danger Signal of Skin Allograft Rejection,» en, *Cell Reports*, vol. 21, n.º 12, págs. 3414-3426, dic. de 2017.
- [382] H. Zimmermann, «Extracellular ATP and other nucleotides—ubiquitous triggers of intercellular messenger release,» en, *Purinergic Signalling*, vol. 12, n.º 1, págs. 25-57, mar. de 2016.
- [383] T. B. Sundberg, H. G. Choi, J.-H. Song y col., «Small-molecule screening identifies inhibition of salt-inducible kinases as a therapeutic strategy to enhance immunoregulatory functions of dendritic cells,» eng, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, n.º 34, págs. 12 468-12 473, ago. de 2014.
- [384] K. Clark, K. F. MacKenzie, K. Petkevicius y col., «Phosphorylation of CRT3 by the salt-inducible kinases controls the interconversion of classically activated and regulatory macrophages,» eng, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, n.º 42, págs. 16 986-16 991, oct. de 2012.
- [385] K. F. MacKenzie, K. Clark, S. Naqvi y col., «PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRT3 pathway,» eng, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 190, n.º 2, págs. 565-577, ene. de 2013.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [386] J. Garay, J. A. D'Angelo, Y. Park y col., «Crosstalk Between PKA and Epac Regulates the Phenotypic Maturation and Function of Human Dendritic Cells,» en, *The Journal of Immunology*, vol. 185, n.º 6, págs. 3227-3238, sep. de 2010.
- [387] Y. Onishi, Z. Fehervari, T. Yamaguchi y S. Sakaguchi, «Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation,» en, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, n.º 29, págs. 10 113-10 118, jul. de 2008.
- [388] S. Ring, A. Pushkarevskaya, H. Schild y col., «Regulatory T Cell-Derived Adenosine Induces Dendritic Cell Migration through the Epac-Rap1 Pathway,» en, *The Journal of Immunology*, vol. 194, n.º 8, págs. 3735-3744, abr. de 2015.
- [389] J. M. Dickenson, S. Reeder, B. Rees, S. Alexander y D. Kendall, «Functional expression of adenosine A2A and A3 receptors in the mouse dendritic cell line XS-106,» en, *European Journal of Pharmacology*, vol. 474, n.º 1, págs. 43-51, ago. de 2003.
- [390] E. Panther, M. Idzko, Y. Herouy y col., «Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells,» en, *The FASEB Journal*, vol. 15, n.º 11, págs. 1963-1970, 2001.
- [391] G. Haskó y B. N. Cronstein, «Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity,» en, *Trends in Immunology*, vol. 25, n.º 1, págs. 33-39, ene. de 2004.
- [392] M. Schnurr, T. Toy, A. Shin y col., «Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells,» *Blood*, vol. 103, n.º 4, págs. 1391-1397, feb. de 2004.
- [393] D. Ferrari, S. Gorini, G. Callegari y A. la Sala, «Shaping immune responses through the activation of dendritic cells-P2 receptors,» en, *Purinergic Signalling*, vol. 3, n.º 1-2, pág. 99, mar. de 2007.

- [394] K. Mahnke, Y. Qian, J. Knop y A. H. Enk, «Induction of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells,» *Blood*, vol. 101, n.º 12, págs. 4862-4869, jun. de 2003.
- [395] K. Mahnke, S. Ring y A. H. Enk, «Antibody Targeting of “Steady-State” Dendritic Cells Induces Tolerance Mediated by Regulatory T Cells,» *Frontiers in Immunology*, vol. 7, 2016.
- [396] M. Idzko, S. Dichmann, D. Ferrari y col., «Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2<sub>y</sub> receptors,» *Blood*, vol. 100, n.º 3, págs. 925-932, ago. de 2002.
- [397] S. Deaglio, K. M. Dwyer, W. Gao y col., «Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression,» eng, *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, n.º 6, págs. 1257-1265, jun. de 2007.
- [398] S. Ring, S. J. Oliver, B. N. Cronstein, A. H. Enk y K. Mahnke, «CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine-dependent mechanism,» en, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 123, n.º 6, 1287-1296.e2, jun. de 2009.
- [399] C. Silva-Vilches, S. Ring y K. Mahnke, «ATP and Its Metabolite Adenosine as Regulators of Dendritic Cell Activity,» *Frontiers in Immunology*, vol. 9, pág. 2581, nov. de 2018.
- [400] D. Wu, E. D. Lewis, M. Pae y S. N. Meydani, «Nutritional Modulation of Immune Function: Analysis of Evidence, Mechanisms, and Clinical Relevance,» eng, *Frontiers in Immunology*, vol. 9, pág. 3160, 2018.
- [401] P. C. Calder, «Metabolic benefits of marine n-3 fatty acids demonstrated in nonhuman primates,» eng, *The Journal of Nutrition*, vol. 144, n.º 1, págs. 1-2, ene. de 2014.
- [402] V. A. Paschoal, M. a. R. Vinolo, A. R. Crisma, J. Magdalon y R. Curi, «Eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acid differentially

## BIBLIOGRAFÍA

---

- modulate rat neutrophil function in vitro,» eng, *Lipids*, vol. 48, n.º 2, págs. 93-103, feb. de 2013.
- [403] E. A. Gurzell, H. Teague, M. Harris, J. Clinthorne, S. R. Shaikh y J. I. Fenton, «DHA-enriched fish oil targets B cell lipid microdomains and enhances ex vivo and in vivo B cell function,» en, *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 93, n.º 4, págs. 463-470, 2013.
- [404] L. S. Sorensen, O. Thorlacius-Ussing, H. H. Rasmussen y col., «Effects of Perioperative Supplementation with Omega-3 Fatty Acids on Leukotriene B4 and Leukotriene B5 Production by Stimulated Neutrophils in Patients with Colorectal Cancer: A Randomized, Placebo-Controlled Intervention Trial,» en, *Nutrients*, vol. 6, n.º 10, págs. 4043-4057, oct. de 2014.
- [405] A. Yessoufou, A. Plé, K. Moutairou, A. Hichami y N. A. Khan, «Docosahexaenoic acid reduces suppressive and migratory functions of CD4CD25 regulatory T-cells,» English, *Journal of Lipid Research*, vol. 50, n.º 12, págs. 2377-2388, dic. de 2009.
- [406] S. Gutiérrez, S. L. Svahn y M. E. Johansson, «Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n.º 20, págs. 5028, oct. de 2019.
- [407] X. Bi, F. Li, S. Liu y col., « $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids ameliorate type 1 diabetes and autoimmunity,» en, *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 127, n.º 5, págs. 1757-1771, mayo de 2017.
- [408] K. Fritsche, «Fatty Acids as Modulators of the Immune Response,» *Annual Review of Nutrition*, vol. 26, n.º 1, págs. 45-73, 2006.
- [409] M.-O. Husson, D. Ley, C. Portal y col., «Modulation of host defence against bacterial and viral infections by omega-3 polyunsaturated fatty acids,» en, *Journal of Infection*, vol. 73, n.º 6, págs. 523-535, dic. de 2016.
- [410] C. M. Yates, P. C. Calder y G. Ed Rainger, «Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease,» en, *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 141, n.º 3, págs. 272-282, mar. de 2014.

- [411] W. Kong, J.-H. Yen, E. Vassiliou, S. Adhikary, M. G. Toscano y D. Ganea, «Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation and in vitro and in vivo expression of the IL-12 cytokine family,» *Lipids in Health and Disease*, vol. 9, n.º 1, pág. 12, feb. de 2010.
- [412] H. Wang, Q. Hao, Q.-R. Li y col., « $\omega$ -3 Polyunsaturated fatty acids affect lipopolysaccharide-induced maturation of dendritic cells through mitogen-activated protein kinases p38,» en, *Nutrition*, vol. 23, n.º 6, págs. 474-482, jun. de 2007.
- [413] F. Zapata-Gonzalez, F. Rueda, J. Petríz y col., «Human dendritic cell activities are modulated by the omega-3 fatty acid, docosahexaenoic acid, mainly through PPAR $\gamma$ :RXR heterodimers: comparison with other polyunsaturated fatty acids,» en, *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 84, n.º 4, págs. 1172-1182, 2008.
- [414] M. Zeyda, B. M. Kirsch, R. Geyeregger y col., «Inhibition of Human Dendritic Cell Maturation and Function by the Novel Immunosuppressant FK778,» en-US, *Transplantation*, vol. 80, n.º 8, págs. 1105-1111, oct. de 2005.
- [415] J. A. Carlsson, A. E. Wold, A.-S. Sandberg y S. M. Östman, «The Polyunsaturated Fatty Acids Arachidonic Acid and Docosahexaenoic Acid Induce Mouse Dendritic Cells Maturation but Reduce T-Cell Responses In Vitro,» en, *PLOS ONE*, vol. 10, n.º 11, e0143741, nov. de 2015.
- [416] M. Zeyda, M. D. Säemann, K. M. Stuhlmeier y col., «Polyunsaturated Fatty Acids Block Dendritic Cell Activation and Function Independently of NF- $\kappa$ B Activation \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n.º 14, págs. 14 293-14 301, abr. de 2005.
- [417] A. Marquardt, H. Stöhr, K. White y B. H. Weber, «cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family,» eng, *Genomics*, vol. 66, n.º 2, págs. 175-183, jun. de 2000.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [418] Y. S. Aulchenko, S. Ripatti, I. Lindqvist y col., «Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts,» *Nature genetics*, vol. 41, n.º 1, págs. 47-55, ene. de 2009.
- [419] S. Kathiresan, C. J. Willer, G. M. Peloso y col., «Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia,» en, *Nature Genetics*, vol. 41, n.º 1, págs. 56-65, ene. de 2009.
- [420] G. Malerba, L. Schaeffer, L. Xumerle y col., «SNPs of the FADS Gene Cluster are Associated with Polyunsaturated Fatty Acids in a Cohort of Patients with Cardiovascular Disease,» en, *Lipids*, vol. 43, n.º 4, págs. 289-299, 2008.
- [421] T. Tanaka, J. Shen, G. R. Abecasis y col., «Genome-Wide Association Study of Plasma Polyunsaturated Fatty Acids in the InCHIANTI Study,» en, *PLOS Genetics*, vol. 5, n.º 1, e1000338, ene. de 2009.
- [422] F. Pédrone, H. Blanchard, M. Kloareg y col., «The fatty acid desaturase 3 gene encodes for different FADS3 protein isoforms in mammalian tissues,» English, *Journal of Lipid Research*, vol. 51, n.º 3, págs. 472-479, mar. de 2010.
- [423] X.-H. Ma, S.-J. Hu, H. Ni y col., «Serial Analysis of Gene Expression in Mouse Uterus at the Implantation Site \*,» English, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, n.º 14, págs. 9351-9360, abr. de 2006.
- [424] T. Tondreau, M. Dejenefte, N. Meuleman y col., «Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells,» *BMC Genomics*, vol. 9, n.º 1, pág. 166, abr. de 2008.
- [425] J. Y. Zhang, X. Qin, A. Liang y col., «Fads3 modulates docosahexaenoic acid in liver and brain,» en, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 123, págs. 25-32, ago. de 2017.
- [426] J. T. Brenna y S. E. Carlson, «Docosahexaenoic acid and human brain development: Evidence that a dietary supply is needed for optimal development,» en, *Journal of Human Evolution*, The Role of Freshwater and

- Marine Resources in the Evolution of the Human Diet, Brain and Behavior, vol. 77, págs. 99-106, dic. de 2014.
- [427] D. R. Hoffman, J. A. Boettcher y D. A. Diersen-Schade, «Toward optimizing vision and cognition in term infants by dietary docosahexaenoic and arachidonic acid supplementation: A review of randomized controlled trials,» en, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, Workshop on DHA as a Required Nutrient, vol. 81, n.º 2, págs. 151-158, ago. de 2009.
- [428] D. Much, S. Brunner, C. Vollhardt y col., «Effect of dietary intervention to reduce the n-6/n-3 fatty acid ratio on maternal and fetal fatty acid profile and its relation to offspring growth and body composition at 1 year of age,» en, *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 67, n.º 3, págs. 282-288, mar. de 2013.
- [429] F. A. J. Muskiet, S. A. van Goor, R. S. Kuipers y col., «Long-chain polyunsaturated fatty acids in maternal and infant nutrition,» en, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, Proceedings of the 7th Fatty Acid and Cell Signaling (FACS) workshop held in Paris on September 28-30, 2005, vol. 75, n.º 3, págs. 135-144, sep. de 2006.
- [430] E. Hauben, S. Gregori, E. Draghici y col., «Activation of the aryl hydrocarbon receptor promotes allograft-specific tolerance through direct and dendritic cell-mediated effects on regulatory T cells,» *Blood*, vol. 112, n.º 4, págs. 1214-1222, ago. de 2008.
- [431] N. I. Kerkvliet, L. B. Steppan, W. Vorachek y col., «Activation of aryl hydrocarbon receptor by TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3+ T cells in pancreatic lymph nodes,» *Immunotherapy*, vol. 1, n.º 4, págs. 539-547, jul. de 2009.
- [432] B. P. Lawrence, M. S. Denison, H. Novak y col., «Activation of the aryl hydrocarbon receptor is essential for mediating the anti-inflammatory effects of a novel low-molecular-weight compound,» eng, *Blood*, vol. 112, n.º 4, págs. 1158-1165, ago. de 2008.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [433] F. J. Quintana, A. Yeste e I. D. Mascanfroni, «Role and therapeutic value of dendritic cells in central nervous system autoimmunity,» en, *Cell Death & Differentiation*, vol. 22, n.º 2, págs. 215-224, feb. de 2015.
- [434] S. H. Chng, P. Kundu, C. Dominguez-Brauer y col., «Ablating the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in CD11c+ cells perturbs intestinal epithelium development and intestinal immunity,» en, *Scientific Reports*, vol. 6, n.º 1, pág. 23 820, abr. de 2016.
- [435] N. T. Nguyen, A. Kimura, T. Nakahama y col., «Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism,» en, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, n.º 46, págs. 19 961-19 966, nov. de 2010.
- [436] T. H. Thatcher, M. A. Williams, S. J. Pollock y col., «Endogenous ligands of the aryl hydrocarbon receptor regulate lung dendritic cell function,» en, *Immunology*, vol. 147, n.º 1, págs. 41-54, 2016.
- [437] C. Goudot, A. Coillard, A.-C. Villani y col., «Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages,» eng, *Immunity*, vol. 47, n.º 3, 582-596.e6, sep. de 2017.
- [438] V. Rothhammer y F. J. Quintana, «The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease,» en, *Nature Reviews Immunology*, vol. 19, n.º 3, págs. 184-197, mar. de 2019.
- [439] S. Mulero-Navarro y P. M. Fernandez-Salguero, «New Trends in Aryl Hydrocarbon Receptor Biology,» en, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 4, mayo de 2016.
- [440] J. Bankoti, A. Burnett, S. Navarro, A. K. Miller, B. Rase y D. M. Shepherd, «Effects of TCDD on the fate of naive dendritic cells,» eng, *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, vol. 115, n.º 2, págs. 422-434, jun. de 2010.
- [441] F. J. Quintana, G. Murugaiyan, M. F. Farez y col., «An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis,» en, *Proceedings of the Na-*



- tional Academy of Sciences*, vol. 107, n.º 48, págs. 20 768-20 773, nov. de 2010.
- [442] C. F. A. Vogel, S. R. Goth, B. Dong, I. N. Pessah y F. Matsumura, «Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase,» eng, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 375, n.º 3, págs. 331-335, oct. de 2008.
- [443] S. Kado, W. L. W. Chang, A. N. Chi, M. Wolny, D. M. Shepherd y C. F. A. Vogel, «Aryl hydrocarbon receptor signaling modifies Toll-like receptor-regulated responses in human dendritic cells,» eng, *Archives of Toxicology*, vol. 91, n.º 5, págs. 2209-2221, mayo de 2017.
- [444] S. J. Gurczynski, N. L. Pereira, S. M. Hrycaj, C. Wilke, R. L. Zemans y B. B. Moore, «Stem cell transplantation uncovers TDO-AHR regulation of lung dendritic cells in herpesvirus-induced pathology,» eng, *JCI insight*, vol. 6, n.º 2, pág. 139 965, ene. de 2021.
- [445] J. D. Mezrich, J. H. Fechner, X. Zhang, B. P. Johnson, W. J. Burlingham y C. A. Bradfield, «An Interaction between Kynurenine and the Aryl Hydrocarbon Receptor Can Generate Regulatory T Cells,» en, *The Journal of Immunology*, vol. 185, n.º 6, págs. 3190-3198, sep. de 2010.
- [446] W.-B. Hwang, D.-J. Kim, G.-S. Oh y J.-H. Park, «Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Indoxyl 3-sulfate and Indole-3-carbinol Inhibit FMS-like Tyrosine Kinase 3 Ligand-induced Bone Marrow-derived plasmacytoid Dendritic Cell Differentiation,» eng, *Immune Network*, vol. 18, n.º 5, e35, oct. de 2018.
- [447] P. Wei, G.-h. Hu, H.-y. Kang y col., «An aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress the Th17 response in allergic rhinitis patients,» en, *Laboratory Investigation*, vol. 94, n.º 5, págs. 528-535, mayo de 2014.
- [448] P. Ettmayer, P. Mayer, F. Kalthoff y col., «A novel low molecular weight inhibitor of dendritic cells and B cells blocks allergic inflammation,» eng,

## BIBLIOGRAFÍA

---

- American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 173, n.º 6, págs. 599-606, mar. de 2006.
- [449] N. Baba, M. Rubio, L. Kenins y col., «The aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand VAF347 selectively acts on monocytes and naïve CD4(+) Th cells to promote the development of IL-22-secreting Th cells,» eng, *Human Immunology*, vol. 73, n.º 8, págs. 795-800, ago. de 2012.
- [450] B. Platzner, S. Richter, D. Kneidinger, D. Waltenberger, M. Woisetschläger y H. Strobl, «Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits in vitro differentiation of human monocytes and Langerhans dendritic cells,» eng, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 183, n.º 1, págs. 66-74, jul. de 2009.
- [451] S. Thordardottir, B. N. Hangalapura, T. Hutten y col., «The aryl hydrocarbon receptor antagonist StemRegenin 1 promotes human plasmacytoid and myeloid dendritic cell development from CD34+ hematopoietic progenitor cells,» eng, *Stem Cells and Development*, vol. 23, n.º 9, págs. 955-967, mayo de 2014.
- [452] J. Bankoti, B. Rase, T. Simones y D. M. Shepherd, «Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells,» eng, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 246, n.º 1-2, págs. 18-28, jul. de 2010.
- [453] C. A. Beamer, J. M. Kreitinger, S. L. Cole y D. M. Shepherd, «Targeted deletion of the aryl hydrocarbon receptor in dendritic cells prevents thymic atrophy in response to dioxin,» eng, *Archives of Toxicology*, vol. 93, n.º 2, págs. 355-368, feb. de 2019.
- [454] G.-B. Jin, A. J. Moore, J. L. Head, J. J. Neumiller y B. P. Lawrence, «Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Reduces Dendritic Cell Function during Influenza Virus Infection,» *Toxicological Sciences*, vol. 116, n.º 2, págs. 514-522, ago. de 2010.

- [455] B. A. Vorderstrasse y N. I. Kerkvliet, «2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects the number and function of murine splenic dendritic cells and their expression of accessory molecules,» eng, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 171, n.º 2, págs. 117-125, mar. de 2001.
- [456] A. R. Castañeda, K. E. Pinkerton, K. J. Bein y col., «Ambient particulate matter activates the aryl hydrocarbon receptor in dendritic cells and enhances Th17 polarization,» en, *Toxicology Letters*, vol. 292, págs. 85-96, ago. de 2018.
- [457] J. M. Benson y D. M. Shepherd, «Aryl Hydrocarbon Receptor Activation by TCDD Reduces Inflammation Associated with Crohn's Disease,» *Toxicological Sciences*, vol. 120, n.º 1, págs. 68-78, mar. de 2011.
- [458] P. Guernonprez, J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Théry y S. Amigorena, «Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells,» eng, *Annual Review of Immunology*, vol. 20, págs. 621-667, 2002.
- [459] J. H. Noseworthy, C. Lucchinetti, M. Rodriguez y B. G. Weinshenker, «Multiple sclerosis,» eng, *The New England Journal of Medicine*, vol. 343, n.º 13, págs. 938-952, sep. de 2000.
- [460] C. A. Dendrou, L. Fugger y M. A. Friese, «Immunopathology of multiple sclerosis,» eng, *Nature Reviews. Immunology*, vol. 15, n.º 9, págs. 545-558, sep. de 2015.
- [461] M. Sospedra y R. Martin, «Immunology of Multiple Sclerosis,» *Annual Review of Immunology*, vol. 23, n.º 1, págs. 683-747, 2005.
- [462] M. Sospedra y R. Martin, «Immunology of Multiple Sclerosis,» eng, *Seminars in Neurology*, vol. 36, n.º 2, págs. 115-127, abr. de 2016.
- [463] P. Duquette, J. Pleines, M. Girard, L. Charest, M. Senecal-Quevillon y C. Masse, «The increased susceptibility of women to multiple sclerosis,» eng, *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, vol. 19, n.º 4, págs. 466-471, nov. de 1992.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [464] C. F. Brosnan y C. S. Raine, «Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis,» eng, *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, vol. 6, n.º 3, págs. 243-257, jul. de 1996.
- [465] H. F. McFarland y S. Dhib-Jalbut, «Multiple sclerosis: possible immunological mechanisms,» eng, *Clinical Immunology and Immunopathology*, vol. 50, n.º 1 Pt 2, S96-105, ene. de 1989.
- [466] J. F. Kurtzke, «Multiple sclerosis: changing times,» eng, *Neuroepidemiology*, vol. 10, n.º 1, págs. 1-8, 1991.
- [467] J. Benito-León, D. Pisa, R. Alonso, P. Calleja, M. Díaz-Sánchez y L. Carrasco, «Association between multiple sclerosis and Candida species: evidence from a case-control study,» eng, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, vol. 29, n.º 9, págs. 1139-1145, sep. de 2010.
- [468] K. Bjornevik, M. Cortese, B. C. Healy y col., «Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis,» EN, *Science*, ene. de 2022.
- [469] J. Boman, P. M. Roblin, P. Sundström, M. Sandström y M. R. Hammerschlag, «Failure to detect Chlamydia pneumoniae in the central nervous system of patients with MS,» eng, *Neurology*, vol. 54, n.º 1, pág. 265, ene. de 2000.
- [470] D. W. Kimberlin y R. J. Whitley, «Human herpesvirus-6: neurologic implications of a newly-described viral pathogen,» eng, *Journal of Neurovirology*, vol. 4, n.º 5, págs. 474-485, oct. de 1998.
- [471] G. Layh-Schmitt, C. Bendl, U. Hildt y col., «Evidence for infection with Chlamydia pneumoniae in a subgroup of patients with multiple sclerosis,» eng, *Annals of Neurology*, vol. 47, n.º 5, págs. 652-655, mayo de 2000.
- [472] R. T. Ross, «The varicella-zoster virus and multiple sclerosis,» eng, *Journal of Clinical Epidemiology*, vol. 51, n.º 7, págs. 533-535, jul. de 1998.

- [473] C. V. Sumaya, L. W. Myers, G. W. Ellison e Y. Ench, «Increased prevalence and titer of Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis,» eng, *Annals of Neurology*, vol. 17, n.º 4, págs. 371-377, abr. de 1985.
- [474] M. Farrall, «Mapping genetic susceptibility to multiple sclerosis,» eng, *Lancet (London, England)*, vol. 348, n.º 9043, págs. 1674-1675, dic. de 1996.
- [475] O. Olerup y J. Hillert, «HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation,» eng, *Tissue Antigens*, vol. 38, n.º 1, págs. 1-15, jul. de 1991.
- [476] E. A. Kabat, D. H. Moore y H. Landow, «AN ELECTROPHORETIC STUDY OF THE PROTEIN COMPONENTS IN CEREBROSPINAL FLUID AND THEIR RELATIONSHIP TO THE SERUM PROTEINS,» eng, *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 21, n.º 5, págs. 571-577, sep. de 1942.
- [477] R. M. Ransohoff y B. Engelhardt, «The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system,» eng, *Nature Reviews. Immunology*, vol. 12, n.º 9, págs. 623-635, sep. de 2012.
- [478] H. Wekerle y R. Hohlfeld, «Molecular mimicry in multiple sclerosis,» eng, *The New England Journal of Medicine*, vol. 349, n.º 2, págs. 185-186, jul. de 2003.
- [479] S. Brocke, C. Piercy y L. Steinman, «Superantigens in demyelinating disease,» eng, *Springer Seminars in Immunopathology*, vol. 18, n.º 1, págs. 51-56, 1996.
- [480] B. Gran, B. Hemmer, M. Vergelli, H. F. McFarland y R. Martin, «Molecular mimicry and multiple sclerosis: degenerate T-cell recognition and the induction of autoimmunity,» eng, *Annals of Neurology*, vol. 45, n.º 5, págs. 559-567, mayo de 1999.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [481] E. J. McMahon, S. L. Bailey, C. V. Castenada, H. Waldner y S. D. Miller, «Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis,» eng, *Nature Medicine*, vol. 11, n.º 3, págs. 335-339, mar. de 2005.
- [482] S. R. Murúa, M. F. Farez y F. J. Quintana, «The Immune Response in Multiple Sclerosis,» eng, *Annual Review of Pathology*, oct. de 2021.
- [483] N. K. de Rosbo y A. Ben-Nun, «T-cell responses to myelin antigens in multiple sclerosis; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein,» eng, *Journal of Autoimmunity*, vol. 11, n.º 4, págs. 287-299, ago. de 1998.
- [484] P. Stinissen, J. Raus y J. Zhang, «Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies,» eng, *Critical Reviews in Immunology*, vol. 17, n.º 1, págs. 33-75, 1997.
- [485] G. Birnbaum y L. Kotilinek, «Heat shock or stress proteins and their role as autoantigens in multiple sclerosis,» eng, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 835, págs. 157-167, dic. de 1997.
- [486] K. Kojima, H. Wekerle, H. Lassmann, T. Berger y C. Linington, «Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+ T cells specific for an astrocyte protein, S100 beta,» eng, *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, vol. 49, págs. 43-51, 1997.
- [487] R. M. Ransohoff, «Mechanisms of inflammation in MS tissue: adhesion molecules and chemokines,» eng, *Journal of Neuroimmunology*, vol. 98, n.º 1, págs. 57-68, jul. de 1999.
- [488] G. A. Rosenberg, «Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis,» eng, *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, vol. 8, n.º 6, págs. 586-595, dic. de 2002.

- [489] T. A. Yednock, C. Cannon, L. C. Fritz, F. Sanchez-Madrid, L. Steinman y N. Karin, «Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin,» eng, *Nature*, vol. 356, n.º 6364, págs. 63-66, mar. de 1992.
- [490] C. Coisne, W. Mao y B. Engelhardt, «Cutting edge: Natalizumab blocks adhesion but not initial contact of human T cells to the blood-brain barrier in vivo in an animal model of multiple sclerosis,» eng, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 182, n.º 10, págs. 5909-5913, mayo de 2009.
- [491] E. D. Ponomarev, L. P. Shriver, K. Maresz y B. N. Dittel, «Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity,» eng, *Journal of Neuroscience Research*, vol. 81, n.º 3, págs. 374-389, ago. de 2005.
- [492] E. Ulvestad, K. Williams, R. Bjerkvig, K. Tiekotter, J. Antel y R. Matre, «Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells,» eng, *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 56, n.º 6, págs. 732-740, dic. de 1994.
- [493] V. Brucklacher-Waldert, K. Stuermer, M. Kolster, J. Wolthausen y E. Tolosa, «Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis,» eng, *Brain: A Journal of Neurology*, vol. 132, n.º Pt 12, págs. 3329-3341, dic. de 2009.
- [494] H. Kebir, K. Kreymborg, I. Ifergan y col., «Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation,» eng, *Nature Medicine*, vol. 13, n.º 10, págs. 1173-1175, oct. de 2007.
- [495] M. K. Racke, «Immunopathogenesis of multiple sclerosis,» *Annals of Indian Academy of Neurology*, vol. 12, n.º 4, págs. 215-220, 2009.
- [496] G. C. Brown, «Nitric oxide and neuronal death,» eng, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, vol. 23, n.º 3, págs. 153-165, nov. de 2010.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [497] J. R. Lees, P. T. Golumbek, J. Sim, D. Dorsey y J. H. Russell, «Regional CNS responses to IFN-gamma determine lesion localization patterns during EAE pathogenesis,» eng, *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, n.º 11, págs. 2633-2642, oct. de 2008.
- [498] K. Ohl, K. Tenbrock y M. Kipp, «Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action,» eng, *Experimental Neurology*, vol. 277, págs. 58-67, mar. de 2016.
- [499] K. W. Selmaj y C. S. Raine, «Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro,» eng, *Annals of Neurology*, vol. 23, n.º 4, págs. 339-346, abr. de 1988.
- [500] H. S. Suidan, J. Bouvier, E. Schaerer, S. R. Stone, D. Monard y J. Tschopp, «Granzyme A released upon stimulation of cytotoxic T lymphocytes activates the thrombin receptor on neuronal cells and astrocytes,» eng, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, n.º 17, págs. 8112-8116, ago. de 1994.
- [501] V. W. Yong, C. Power, P. Forsyth y D. R. Edwards, «Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system,» eng, *Nature Reviews. Neuroscience*, vol. 2, n.º 7, págs. 502-511, jul. de 2001.
- [502] C.-C. Chao, C. Gutiérrez-Vázquez, V. Rothhammer y col., «Metabolic Control of Astrocyte Pathogenic Activity via cPLA2-MAVS,» eng, *Cell*, vol. 179, n.º 7, 1483-1498.e22, dic. de 2019.
- [503] S. J. Piddlesden, H. Lassmann, F. Zimprich, B. P. Morgan y C. Lington, «The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement,» eng, *The American Journal of Pathology*, vol. 143, n.º 2, págs. 555-564, ago. de 1993.
- [504] A. Bar-Or, L. Fawaz, B. Fan y col., «Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS?» eng, *Annals of Neurology*, vol. 67, n.º 4, págs. 452-461, abr. de 2010.



- [505] O. Aktas, A. Smorodchenko, S. Brocke y col., «Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL,» eng, *Neuron*, vol. 46, n.º 3, págs. 421-432, mayo de 2005.
- [506] A. Bar-Or, «Immunology of multiple sclerosis,» eng, *Neurologic Clinics*, vol. 23, n.º 1, págs. 149-175, vii, feb. de 2005.
- [507] I. D. Mascalfroni, A. Yeste, S. M. Vieira y col., «IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39,» eng, *Nature Immunology*, vol. 14, n.º 10, págs. 1054-1063, oct. de 2013.
- [508] G. Frisullo, V. Nociti, R. Iorio y col., «Regulatory T cells fail to suppress CD4+T-bet+ T cells in relapsing multiple sclerosis patients,» *Immunology*, vol. 127, n.º 3, págs. 418-428, jul. de 2009.
- [509] D. E. Lowther y D. A. Hafler, «Regulatory T cells in the central nervous system,» eng, *Immunological Reviews*, vol. 248, n.º 1, págs. 156-169, jul. de 2012.
- [510] L. Steinman, «Immunology of relapse and remission in multiple sclerosis,» eng, *Annual Review of Immunology*, vol. 32, págs. 257-281, 2014.
- [511] A. R. Pachner, «Experimental models of multiple sclerosis,» en-US, *Current Opinion in Neurology*, vol. 24, n.º 3, págs. 291-299, jun. de 2011.
- [512] G. Krishnamoorthy y H. Wekerle, «EAE: An immunologist's magic eye,» en, *European Journal of Immunology*, vol. 39, n.º 8, págs. 2031-2035, 2009.
- [513] S. Bittner, M. A. Bauer, P. Ehling y col., «The TASK1 channel inhibitor A293 shows efficacy in a mouse model of multiple sclerosis,» en, *Experimental Neurology*, vol. 238, n.º 2, págs. 149-155, dic. de 2012.
- [514] A. E. Handel, M. R. Lincoln y S. V. Ramagopalan, «Of mice and men: experimental autoimmune encephalitis and multiple sclerosis,» en, *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 41, n.º 11, págs. 1254-1258, 2011.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [515] A. P. ROBINSON, C. T. HARP, A. NORONHA y S. D. MILLER, «The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment,» *Handbook of clinical neurology*, vol. 122, págs. 173-189, 2014.
- [516] S. Miyamura, N. Matsuo, K. Nagayasu, H. Shirakawa y S. Kaneko, «Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein 35-55 (MOG 35-55)-induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: A Model of Chronic Multiple Sclerosis,» *Bio-protocol*, vol. 9, n.º 24, e3453-e3453, dic. de 2019.
- [517] S. Bittner, A. M. Afzali, H. Wiendl y S. G. Meuth, «Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG35-55) Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 Mice,» *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, n.º 86, pág. 51 275, abr. de 2014.
- [518] R. M. Steinman, «Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future,» *Annual Review of Immunology*, vol. 30, n.º 1, págs. 1-22, 2012.
- [519] A. Nylander y D. A. Hafler, «Multiple sclerosis,» eng, *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, n.º 4, págs. 1180-1188, abr. de 2012.
- [520] R. Lande, V. Gafa, B. Serafini y col., «Plasmacytoid Dendritic Cells in Multiple Sclerosis: Intracerebral Recruitment and Impaired Maturation in Response to Interferon- $\beta$ ,» *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, vol. 67, n.º 5, págs. 388-401, mayo de 2008.
- [521] A. L. F. Longhini, F. von Glehn, C. O. Brandão y col., «Plasmacytoid dendritic cells are increased in cerebrospinal fluid of untreated patients during multiple sclerosis relapse,» *Journal of Neuroinflammation*, vol. 8, n.º 1, pág. 2, ene. de 2011.
- [522] N. Yogev, F. Frommer, D. Lukas y col., «Dendritic Cells Ameliorate Autoimmunity in the CNS by Controlling the Homeostasis of PD-1 Receptor+ Regulatory T Cells,» en, *Immunity*, vol. 37, n.º 2, págs. 264-275, ago. de 2012.

- [523] J. L. Coombes, K. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Cárcamo y col., «A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- $\beta$ - and retinoic acid-dependent mechanism,» *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, n.º 8, págs. 1757-1764, jul. de 2007.
- [524] U. Grohmann, F. Fallarino y P. Puccetti, «Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO,» en *Trends in Immunology*, vol. 24, n.º 5, págs. 242-248, mayo de 2003.
- [525] C.-M. Sun, J. A. Hall, R. B. Blank y col., «Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid,» *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, n.º 8, págs. 1775-1785, jul. de 2007.
- [526] A. Awasthi, Y. Carrier, J. P. S. Peron y col., «A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells,» en *Nature Immunology*, vol. 8, n.º 12, págs. 1380-1389, dic. de 2007.
- [527] H. Y. Wu, F. J. Quintana, A. P. d. Cunha y col., «In Vivo Induction of Tr1 Cells via Mucosal Dendritic Cells and AHR Signaling,» en *PLOS ONE*, vol. 6, n.º 8, e23618, ago. de 2011.
- [528] L. Bar-On, T. Birnberg, K.-w. Kim y S. Jung, «Dendritic cell-restricted CD80/86 deficiency results in peripheral regulatory T-cell reduction but is not associated with lymphocyte hyperactivation,» en *European Journal of Immunology*, vol. 41, n.º 2, págs. 291-298, 2011.
- [529] S. J. Kim y B. Diamond, «Modulation of tolerogenic dendritic cells and autoimmunity,» eng, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 41, págs. 49-58, mayo de 2015.
- [530] S. L. Bailey-Bucktrout, S. C. Caulkins, G. Goings, J. A. A. Fischer, A. Dzionek y S. D. Miller, «Cutting edge: central nervous system plasmacytoid dendritic cells regulate the severity of relapsing experimental autoim-

## BIBLIOGRAFÍA

---

- mune encephalomyelitis,» eng, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 180, n.º 10, págs. 6457-6461, mayo de 2008.
- [531] C. M. Guinane y P. D. Cotter, «Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ,» en, *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, vol. 6, n.º 4, págs. 295-308, jul. de 2013.
- [532] N. Geva-Zatorsky, E. Sefik, L. Kua y col., «Mining the Human Gut Microbiota for Immunomodulatory Organisms,» eng, *Cell*, vol. 168, n.º 5, 928-943.e11, feb. de 2017.
- [533] K. Honda y D. R. Littman, «The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease,» eng, *Nature*, vol. 535, n.º 7610, págs. 75-84, jul. de 2016.
- [534] I. Miller, «The gut–brain axis: historical reflections,» *Microbial Ecology in Health and Disease*, vol. 29, n.º 2, pág. 1 542 921, nov. de 2018.
- [535] W. A., «The Mind-Gut Connection: How the Hidden Conversation Within Our Bodies Impacts Our Mood, Our Choices, and Our Overall Health,» ko, *Nature*, vol. 536, n.º 7615, págs. 146-147, 2016.
- [536] R. Knight y B. Buhler, *Follow Your Gut: The Enormous Impact of Tiny Microbes*, en. Simon y Schuster, abr. de 2015.
- [537] O. Mossad y D. Erny, «The microbiota–microglia axis in central nervous system disorders,» en, *Brain Pathology*, vol. 30, n.º 6, págs. 1159-1177, 2020.
- [538] A. Kadowaki y F. J. Quintana, «The Gut–CNS Axis in Multiple Sclerosis,» en, *Trends in Neurosciences*, vol. 43, n.º 8, págs. 622-634, ago. de 2020.
- [539] K. Berer, M. Mues, M. Koutrolos y col., «Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination,» eng, *Nature*, vol. 479, n.º 7374, págs. 538-541, oct. de 2011.
- [540] A. Haghikia, S. Jörg, A. Duscha y col., «Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine,» eng, *Immunity*, vol. 43, n.º 4, págs. 817-829, oct. de 2015.

- [541] J. Ochoa-Repáraz, D. W. Mielcarz, L. E. Ditrio y col., «Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis,» eng, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 183, n.º 10, págs. 6041-6050, nov. de 2009.
- [542] H. Yokote, S. Miyake, J. L. Croxford, S. Oki, H. Mizusawa y T. Yamamura, «NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora,» eng, *The American Journal of Pathology*, vol. 173, n.º 6, págs. 1714-1723, dic. de 2008.
- [543] I. I. Ivanov, K. Atarashi, N. Manel y col., «Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria,» eng, *Cell*, vol. 139, n.º 3, págs. 485-498, oct. de 2009.
- [544] D. Erturk-Hasdemir, S. F. Oh, N. A. Okan y col., «Symbionts exploit complex signaling to educate the immune system,» eng, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pág. 201915978, dic. de 2019.
- [545] S. K. Mazmanian, J. L. Round y D. L. Kasper, «A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease,» eng, *Nature*, vol. 453, n.º 7195, págs. 620-625, mayo de 2008.
- [546] J. Ochoa-Repáraz, D. W. Mielcarz, Y. Wang y col., «A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease,» eng, *Mucosal Immunology*, vol. 3, n.º 5, págs. 487-495, sep. de 2010.
- [547] J. Ochoa-Repáraz, D. W. Mielcarz, L. E. Ditrio y col., «Central nervous system demyelinating disease protection by the human commensal *Bacteroides fragilis* depends on polysaccharide A expression,» eng, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 185, n.º 7, págs. 4101-4108, oct. de 2010.
- [548] J. L. Round, S. M. Lee, J. Li y col., «The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota,» eng, *Science (New York, N. Y.)*, vol. 332, n.º 6032, págs. 974-977, mayo de 2011.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [549] Y. Wang, S. Begum-Haque, K. M. Telesford y col., «A commensal bacterial product elicits and modulates migratory capacity of CD39(+) CD4 T regulatory subsets in the suppression of neuroinflammation,» eng, *Gut Microbes*, vol. 5, n.º 4, págs. 552-561, jul. de 2014.
- [550] Y. Wang, K. M. Telesford, J. Ochoa-Repáraz y col., «An intestinal commensal symbiosis factor controls neuroinflammation via TLR2-mediated CD39 signalling,» en, *Nature Communications*, vol. 5, n.º 1, pág. 4432, jul. de 2014.
- [551] Y. Furusawa, Y. Obata, S. Fukuda y col., «Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells,» eng, *Nature*, vol. 504, n.º 7480, págs. 446-450, dic. de 2013.
- [552] K. Atarashi, T. Tanoue, T. Shima y col., «Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species,» eng, *Science (New York, N. Y.)*, vol. 331, n.º 6015, págs. 337-341, ene. de 2011.
- [553] K. Atarashi, T. Tanoue, K. Oshima y col., «Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota,» eng, *Nature*, vol. 500, n.º 7461, págs. 232-236, ago. de 2013.
- [554] J. C. Schroeder, B. C. Dinatale, I. A. Murray y col., «The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor,» eng, *Biochemistry*, vol. 49, n.º 2, págs. 393-400, ene. de 2010.
- [555] T. Zelante, R. G. Iannitti, C. Cunha y col., «Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22,» eng, *Immunity*, vol. 39, n.º 2, págs. 372-385, ago. de 2013.
- [556] S. Haase, A. Haghikia, N. Wilck, D. N. Müller y R. A. Linker, «Impacts of microbiome metabolites on immune regulation and autoimmunity,» en, *Immunology*, vol. 154, n.º 2, págs. 230-238, 2018.

- [557] M. Venkatesh, S. Mukherjee, H. Wang y col., «Symbiotic Bacterial Metabolites Regulate Gastrointestinal Barrier Function via the Xenobiotic Sensor PXR and Toll-like Receptor 4,» en, *Immunity*, vol. 41, n.º 2, págs. 296-310, ago. de 2014.
- [558] N. J. C. King y S. R. Thomas, «Molecules in focus: Indoleamine 2,3-dioxygenase,» en, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 39, n.º 12, págs. 2167-2172, ene. de 2007.
- [559] V. Rothhammer, I. D. Mascalfroni, L. Bunse y col., «Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor,» eng, *Nature Medicine*, vol. 22, n.º 6, págs. 586-597, jun. de 2016.
- [560] V. Rothhammer, D. M. Borucki, E. C. Tjon y col., «Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites,» eng, *Nature*, vol. 557, n.º 7707, págs. 724-728, mayo de 2018.
- [561] V. Rothhammer y F. J. Quintana, «Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes,» en, *Seminars in Immunopathology*, vol. 37, n.º 6, págs. 625-638, nov. de 2015.
- [562] I. D. Vainchtein y A. V. Molofsky, «Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health,» en, *Trends in Neurosciences*, vol. 43, n.º 3, págs. 144-154, mar. de 2020.
- [563] V. Rothhammer, D. M. Borucki, J. E. Kenison y col., «Detection of aryl hydrocarbon receptor agonists in human samples,» eng, *Scientific Reports*, vol. 8, n.º 1, pág. 4970, mar. de 2018.
- [564] V. Rothhammer, D. M. Borucki, M. I. Garcia Sanchez y col., «Dynamic regulation of serum aryl hydrocarbon receptor agonists in MS,» en, *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, vol. 4, n.º 4, e359, jul. de 2017.
- [565] U. Vyas y N. Ranganathan, «Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Gut and Beyond,» en, *Gastroenterology Research and Practice*, vol. 2012, e872716, sep. de 2012.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [566] A. S. Andreasen, N. Larsen, T. Pedersen-Skovsgaard y col., «Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects,» en, *British Journal of Nutrition*, vol. 104, n.º 12, págs. 1831-1838, dic. de 2010.
- [567] R. Bibiloni, R. N. Fedorak, G. W. Tannock y col., «VSL#3 Probiotic Mixture Induces Remission in Patients with Active Ulcerative Colitis,» en-US, *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*, vol. 100, n.º 7, págs. 1539-1546, jul. de 2005.
- [568] Y. Kadooka, M. Sato, K. Imaizumi y col., «Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial,» en, *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 64, n.º 6, págs. 636-643, jun. de 2010.
- [569] F. De Luca e Y. Shoenfeld, «The microbiome in autoimmune diseases,» eng, *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 195, n.º 1, págs. 74-85, ene. de 2019.
- [570] K. Khazaie, M. Zadeh, M. W. Khan y col., «Abating colon cancer polyposis by *Lactobacillus acidophilus* deficient in lipoteichoic acid,» eng, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, n.º 26, págs. 10 462-10 467, jun. de 2012.
- [571] A. Altenhoefer, S. Oswald, U. Sonnenborn y col., «The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens,» eng, *FEMS immunology and medical microbiology*, vol. 40, n.º 3, págs. 223-229, abr. de 2004.
- [572] L. Mandel, I. Trebichavsky, I. Splichal y J. Schulze, «Stimulation of intestinal immune cells by *E. coli* in gnotobiotic piglets,» eng, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 371A, págs. 463-464, 1995.
- [573] U. Sonnenborn y J. Schulze, «The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 – features of a versatile probiotic,» *Microbial Ecology in Health and Disease*, vol. 21, n.º 3-4, págs. 122-158, ene. de 2009.



- [574] U. Helwig, K. M. Lammers, F. Rizzello y col., «Lactobacilli, bifidobacteria and E. coli nisse induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells,» eng, *World Journal of Gastroenterology*, vol. 12, n.º 37, págs. 5978-5986, oct. de 2006.
- [575] J.-M. Otte y D. K. Podolsky, «Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms,» eng, *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 286, n.º 4, G613-626, abr. de 2004.
- [576] A. Sturm, K. Rilling, D. C. Baumgart y col., «Escherichia coli Nisse 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling,» eng, *Infection and Immunity*, vol. 73, n.º 3, págs. 1452-1465, mar. de 2005.
- [577] M. Schultz, «Clinical use of E. coli Nisse 1917 in inflammatory bowel disease,» *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 14, n.º 7, págs. 1012-1018, jul. de 2008.
- [578] D. S. Leventhal, A. Sokolovska, N. Li y col., «Immunotherapy with engineered bacteria by targeting the STING pathway for anti-tumor immunity,» en, *Nature Communications*, vol. 11, n.º 1, pág. 2739, jun. de 2020.
- [579] H. K. Eltzschig, M. V. Sitkovsky y S. C. Robson, «Purinergic Signaling during Inflammation,» *New England Journal of Medicine*, vol. 367, n.º 24, págs. 2322-2333, dic. de 2012.
- [580] S. Mariathasan, D. S. Weiss, K. Newton y col., «Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP,» en, *Nature*, vol. 440, n.º 7081, págs. 228-232, mar. de 2006.
- [581] D. Gris, Z. Ye, H. A. Iocca y col., «NLRP3 Plays a Critical Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Mediating Th1 and Th17 Responses,» en, *The Journal of Immunology*, vol. 185, n.º 2, págs. 974-981, jul. de 2010.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [582] L. Han, H. Lei, Z. Tian, X. Wang, D. Cheng y C. Wang, «The immunomodulatory activity and mechanism of docosahexenoic acid (DHA) on immunosuppressive mice models,» en, *Food & Function*, vol. 9, n.º 6, págs. 3254-3263, 2018.
- [583] V. Rothhammer, D. M. Borucki, J. E. Kenison y col., «Detection of aryl hydrocarbon receptor agonists in human samples,» en, *Scientific Reports*, vol. 8, n.º 1, pág. 4970, mar. de 2018.
- [584] F. J. Quintana y D. H. Sherr, «Aryl Hydrocarbon Receptor Control of Adaptive Immunity,» *Pharmacological Reviews*, vol. 65, n.º 4, págs. 1148-1161, oct. de 2013.
- [585] H. Oh y S. Ghosh, «NF- $\kappa$ B: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets,» eng, *Immunological Reviews*, vol. 252, n.º 1, págs. 41-51, mar. de 2013.
- [586] N. Yosef, A. K. Shalek, J. T. Gaublot y col., «Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation,» eng, *Nature*, vol. 496, n.º 7446, págs. 461-468, abr. de 2013.
- [587] F. P. Canale, C. Basso, G. Antonini y col., «Metabolic modulation of tumours with engineered bacteria for immunotherapy,» eng, *Nature*, vol. 598, n.º 7882, págs. 662-666, oct. de 2021.
- [588] M. K. Puurunen, J. Vockley, S. L. Searle y col., «Safety and pharmacodynamics of an engineered E. coli Nissle for the treatment of phenylketonuria: a first-in-human phase 1/2a study,» eng, *Nature Metabolism*, vol. 3, n.º 8, págs. 1125-1132, ago. de 2021.
- [589] E. Meinl, F. Weber, K. Drexler y col., «Myelin basic protein-specific T lymphocyte repertoire in multiple sclerosis. Complexity of the response and dominance of nested epitopes due to recruitment of multiple T cell clones,» eng, *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 92, n.º 6, págs. 2633-2643, dic. de 1993.

- [590] P. A. Muraro, K.-P. Wandinger, B. Bielekova y col., «Molecular tracking of antigen-specific T cell clones in neurological immune-mediated disorders,» *Brain*, vol. 126, n.º 1, págs. 20-31, ene. de 2003.
- [591] C. Skulina, S. Schmidt, K. Dornmair y col., «Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood,» eng, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, n.º 8, págs. 2428-2433, feb. de 2004.
- [592] A. Ben-Nun, H. Wekerle e I. R. Cohen, «The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis,» eng, *European Journal of Immunology*, vol. 11, n.º 3, págs. 195-199, mar. de 1981.
- [593] M. K. Matyszak y V. H. Perry, «The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system,» eng, *Neuroscience*, vol. 74, n.º 2, págs. 599-608, sep. de 1996.
- [594] M. Pashenkov y H. Link, «Pashenkov, M. & Link, H. Dendritic cells and immune responses in the central nervous system. Trends Immunol. 23, 69-70,» *Trends in immunology*, vol. 23, 69-70; author reply 70, mar. de 2002.
- [595] B. Serafini, B. Rosicarelli, R. Magliozzi y col., «Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells,» eng, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 65, n.º 2, págs. 124-141, feb. de 2006.
- [596] A. Alcina, M. D. M. Abad-Grau, M. Fedetz y col., «Multiple sclerosis risk variant HLA-DRB1\*1501 associates with high expression of DRB1 gene in different human populations,» eng, *PloS One*, vol. 7, n.º 1, e29819, 2012.
- [597] J. R. Oksenberg, S. E. Baranzini, S. Sawcer y S. L. Hauser, «The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis,» eng, *Nature Reviews. Genetics*, vol. 9, n.º 7, págs. 516-526, jul. de 2008.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [598] B. N. Dittel, I. Visintin, R. M. Merchant y C. A. Janeway, «Presentation of the self antigen myelin basic protein by dendritic cells leads to experimental autoimmune encephalomyelitis,» eng, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 163, n.º 1, págs. 32-39, jul. de 1999.
- [599] M. Greter, F. L. Heppner, M. P. Lemos y col., «Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis,» eng, *Nature Medicine*, vol. 11, n.º 3, págs. 328-334, mar. de 2005.
- [600] T. Suter, G. Biollaz, D. Gatto y col., «The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation,» eng, *European Journal of Immunology*, vol. 33, n.º 11, págs. 2998-3006, nov. de 2003.
- [601] L. Juricek y X. Coumoul, «The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, n.º 9, pág. 2504, ago. de 2018.
- [602] A. S. Cannon, P. S. Nagarkatti y M. Nagarkatti, «Targeting AhR as a Novel Therapeutic Modality against Inflammatory Diseases,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, n.º 1, pág. 288, dic. de 2021.
- [603] X. Huang, J. A. Powell-Coffman e Y. Jin, «The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in *C. elegans*,» *Development*, vol. 131, n.º 4, págs. 819-828, feb. de 2004.
- [604] M. D. Kim, L. Y. Jan e Y. N. Jan, «The bHLH-PAS protein Spineless is necessary for the diversification of dendrite morphology of *Drosophila* dendritic arborization neurons,» en, *Genes & Development*, vol. 20, n.º 20, págs. 2806-2819, oct. de 2006.
- [605] E. Kimura y C. Tohyama, «Embryonic and Postnatal Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor mRNA in Mouse Brain,» *Frontiers in Neuroanatomy*, vol. 11, 2017.

- [606] C. R. Filbrandt, Z. Wu, B. Zlokovic, L. Opanashuk y T. A. Gasiewicz, «Presence and Functional Activity of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Isolated Murine Cerebral Vascular Endothelial Cells and Astrocytes,» en *NeuroToxicology*, Emerging Issues in Neurotoxicology, vol. 25, n.º 4, págs. 605-616, jun. de 2004.
- [607] A. Kubota, J. J. Stegeman, B. R. Woodin y col., «Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2,» en *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 253, n.º 3, págs. 244-252, jun. de 2011.
- [608] Y. Li, G. Chen, J. Zhao y col., «2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces microglial nitric oxide production and subsequent rat primary cortical neuron apoptosis through p38/JNK MAPK pathway,» en *Toxicology*, vol. 312, págs. 132-141, oct. de 2013.
- [609] L. L. Collins, M. A. Williamson, B. D. Thompson, D. P. Dever, T. A. Gasiewicz y L. A. Opanashuk, «2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Exposure Disrupts Granule Neuron Precursor Maturation in the Developing Mouse Cerebellum,» *Toxicological Sciences*, vol. 103, n.º 1, págs. 125-136, mayo de 2008.
- [610] M. A. Williamson, T. A. Gasiewicz y L. A. Opanashuk, «Aryl Hydrocarbon Receptor Expression and Activity in Cerebellar Granule Neuroblasts: Implications for Development and Dioxin Neurotoxicity,» *Toxicological Sciences*, vol. 83, n.º 2, págs. 340-348, feb. de 2005.
- [611] J. Rzemieniec, E. Litwa, A. Wnuk, W. Lason, W. Krzeptowski y M. Kajta, «Selective Aryl Hydrocarbon Receptor Modulator 3,3'-Diindolylmethane Impairs AhR and ARNT Signaling and Protects Mouse Neuronal Cells Against Hypoxia,» en *Molecular Neurobiology*, vol. 53, n.º 8, págs. 5591-5606, oct. de 2016.
- [612] F. J. Sánchez-Martín, P. M. Fernández-Salguero y J. M. Merino, «2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis in neural growth factor (NGF)-differentiated pheochromocytoma PC12 cells,» en *NeuroToxicology*, vol. 31, n.º 3, págs. 267-276, jun. de 2010.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [613] F. J. Sánchez-Martín, P. M. Fernández-Salguero y J. M. Merino, «Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells from mouse,» en, *Journal of Neurochemistry*, vol. 118, n.º 1, págs. 153-162, 2011.
- [614] R. W. Luebke, C. B. Copeland, M. Daniels, A. L. Lambert y M. I. Gilmour, «Suppression of Allergic Immune Responses to House Dust Mite (HDM) in Rats Exposed to 2,3,7,8-TCDD,» *Toxicological Sciences*, vol. 62, n.º 1, págs. 71-79, jul. de 2001.
- [615] H. Fujimaki, K. Nohara, T. Kobayashi y col., «Effect of a Single Oral Dose of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on Immune Function in Male NC/Nga Mice,» *Toxicological Sciences*, vol. 66, n.º 1, págs. 117-124, mar. de 2002.
- [616] N. B. Marshall, W. R. Vorachek, L. B. Stepan, D. V. Mourich y N. I. Kerkvliet, «Functional Characterization and Gene Expression Analysis of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells Generated in Mice Treated with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- p -Dioxin,» en, *The Journal of Immunology*, vol. 181, n.º 4, págs. 2382-2391, ago. de 2008.
- [617] N. P. Singh, U. P. Singh, B. Singh, R. L. Price, M. Nagarkatti y P. S. Nagarkatti, «Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Leads to Reciprocal Epigenetic Regulation of FoxP3 and IL-17 Expression and Amelioration of Experimental Colitis,» en, *PLOS ONE*, vol. 6, n.º 8, e23522, ago. de 2011.
- [618] F. J. Quintana, A. S. Basso, A. H. Iglesias y col., «Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor,» en, *Nature*, vol. 453, n.º 7191, págs. 65-71, mayo de 2008.
- [619] W. Zou, «Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy,» en, *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, n.º 4, págs. 295-307, abr. de 2006.
- [620] B. C. DiNatale, J. C. Schroeder y G. H. Perdew, «Ah receptor antagonism inhibits constitutive and cytokine inducible IL6 production in

- head and neck tumor cell lines,» *Molecular carcinogenesis*, vol. 50, n.º 3, págs. 173-183, mar. de 2011.
- [621] B. D. Hollingshead, T. V. Beischlag, B. C. Dinatale, P. Ramadoss y G. H. Perdew, «Inflammatory signaling and aryl hydrocarbon receptor mediate synergistic induction of interleukin 6 in MCF-7 cells,» eng, *Cancer Research*, vol. 68, n.º 10, págs. 3609-3617, mayo de 2008.
- [622] N. Podechard, V. Lecureur, E. Le Ferrec y col., «Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation,» eng, *Toxicology letters*, vol. 177, n.º 2, págs. 130-137, mar. de 2008.
- [623] E. M. Sciuillo, B. Dong, C. F. Vogel y F. Matsumura, «Characterization of the pattern of the nongenomic signaling pathway through which TCDD-induces early inflammatory responses in U937 human macrophages,» *Chemosphere*, vol. 74, n.º 11, págs. 1531-1537, mar. de 2009.
- [624] M. Veldhoen, K. Hirota, A. M. Westendorf y col., «The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins,» eng, *Nature*, vol. 453, n.º 7191, págs. 106-109, mayo de 2008.
- [625] M. D. Laiosa, A. Wyman, F. G. Murante y col., «Cell Proliferation Arrest within Intrathymic Lymphocyte Progenitor Cells Causes Thymic Atrophy Mediated by the Aryl Hydrocarbon Receptor,» en, *The Journal of Immunology*, vol. 171, n.º 9, págs. 4582-4591, nov. de 2003.
- [626] M. S. Denison, A. A. Soshilov, G. He, D. E. DeGroot y B. Zhao, «Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor,» eng, *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, vol. 124, n.º 1, págs. 1-22, nov. de 2011.
- [627] L. Apetoh, F. J. Quintana, C. Pot y col., «The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27,» en, *Nature Immunology*, vol. 11, n.º 9, págs. 854-861, sep. de 2010.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [628] R. Gandhi, D. Kumar, E. J. Burns y col., «Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3+ regulatory T cells,» en, *Nature Immunology*, vol. 11, n.º 9, págs. 846-853, sep. de 2010.
- [629] C. R. Maliszewski, G. J. Delespesse, M. A. Schoenborn y col., «The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization,» eng, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 153, n.º 8, págs. 3574-3583, oct. de 1994.
- [630] G. Borsellino, M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri y col., «Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression,» eng, *Blood*, vol. 110, n.º 4, págs. 1225-1232, ago. de 2007.
- [631] N. Álvarez-Sánchez, I. Cruz-Chamorro, M. Díaz-Sánchez, P. J. Lardone, J. M. Guerrero y A. Carrillo-Vico, «Peripheral CD39-expressing T regulatory cells are increased and associated with relapsing-remitting multiple sclerosis in relapsing patients,» *Scientific Reports*, vol. 9, pág. 2302, feb. de 2019.
- [632] M. Visweswaran, K. Hendrawan, J. C. Massey y col., «Sustained immunotolerance in multiple sclerosis after stem cell transplant,» eng, *Annals of Clinical and Translational Neurology*, feb. de 2022.
- [633] M. S. Longhi, A. Moss, A. Bai y col., «Characterization of Human CD39+ Th17 Cells with Suppressor Activity and Modulation in Inflammatory Bowel Disease,» *PLoS ONE*, vol. 9, n.º 2, e87956, feb. de 2014.
- [634] F. Chalmin, G. Mignot, M. Bruchard y col., «Stat3 and Gfi-1 Transcription Factors Control Th17 Cell Immunosuppressive Activity via the Regulation of Ectonucleotidase Expression,» en, *Immunity*, vol. 36, n.º 3, págs. 362-373, mar. de 2012.
- [635] D. Fernández, F. Flores-Santibáñez, J. Neira y col., «Purinergic Signaling as a Regulator of Th17 Cell Plasticity,» *PLoS ONE*, vol. 11, n.º 6, e0157889, jun. de 2016.



- [636] J. Zeng, Z. Ning, Y. Wang y H. Xiong, «Implications of CD39 in immune-related diseases,» en, *International Immunopharmacology*, vol. 89, pág. 107-115, dic. de 2020.
- [637] C. A. Hunter y R. Kastelein, «Interleukin-27: Balancing Protective and Pathological Immunity,» en, *Immunity*, vol. 37, n.º 6, págs. 960-969, dic. de 2012.
- [638] J. D. Bremner, K. Moazzami, M. T. Wittbrodt y col., «Diet, Stress and Mental Health,» eng, *Nutrients*, vol. 12, n.º 8, E2428, ago. de 2020.
- [639] V. Gallai, P. Sarchielli, A. Trequattrini y col., «Cytokine secretion and eicosanoid production in the peripheral blood mononuclear cells of MS patients undergoing dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids,» en, *Journal of Neuroimmunology*, vol. 56, n.º 2, págs. 143-153, feb. de 1995.
- [640] A. Mousavi Nasl-khameneh, A. Mirshafiey, A. Naser Moghadasi y col., «Combination treatment of docosahexaenoic acid (DHA) and all-trans-retinoic acid (ATRA) inhibit IL-17 and ROR $\gamma$ t gene expression in PBMCs of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis,» *Neurological Research*, vol. 40, n.º 1, págs. 11-17, ene. de 2018.
- [641] T. Korn, J. Reddy, W. Gao y col., «Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation,» eng, *Nature Medicine*, vol. 13, n.º 4, págs. 423-431, abr. de 2007.
- [642] E. Bettelli, M. P. Das, E. D. Howard, H. L. Weiner, R. A. Sobel y V. K. Kuchroo, «IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice,» eng, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 161, n.º 7, págs. 3299-3306, oct. de 1998.
- [643] C. N. Serhan, J. Dalli, R. A. Colas, J. W. Winkler y N. Chiang, «Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome,» en, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Oxyge-

## BIBLIOGRAFÍA

---

- nated metabolism of PUFA: analysis and biological relevance, vol. 1851, n.º 4, págs. 397-413, abr. de 2015.
- [644] R. Marion-Letellier, M. Butler, P. Déchelotte, R. J. Playford y S. Ghosh, «Comparison of cytokine modulation by natural peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands with synthetic ligands in intestinal-like Caco-2 cells and human dendritic cells—potential for dietary modulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in intestinal inflammation,» *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 87, n.º 4, págs. 939-948, abr. de 2008.
- [645] S. M. Weldon, A. C. Mullen, C. E. Loscher, L. A. Hurley y H. M. Roche, «Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid,» eng, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 18, n.º 4, págs. 250-258, abr. de 2007.
- [646] E. Oliver, F. McGillicuddy, C. Phillips, S. Toomey y H. M. Roche, «The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA,» eng, *The Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 69, n.º 2, págs. 232-243, mayo de 2010.
- [647] P. Bui, P. Solaimani, X. Wu y O. Hankinson, «2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment alters eicosanoid levels in several organs of the mouse in an aryl hydrocarbon receptor-dependent fashion,» en, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 259, n.º 2, págs. 143-151, mar. de 2012.
- [648] J. Yang, P. Solaimani, H. Dong, B. Hammock y O. Hankinson, «Treatment of mice with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin markedly increases the levels of a number of cytochrome P450 metabolites of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the liver and lung,» *The Journal of Toxicological Sciences*, vol. 38, n.º 6, págs. 833-836, 2013.
- [649] M. Tabbaa, M. Golubic, M. F. Roizen y A. M. Bernstein, «Docosahexaenoic Acid, Inflammation, and Bacterial Dysbiosis in Relation to Periodon-

- tal Disease, Inflammatory Bowel Disease, and the Metabolic Syndrome,» en, *Nutrients*, vol. 5, n.º 8, págs. 3299-3310, ago. de 2013.
- [650] K. Kaliannan, B. Wang, X.-Y. Li, K.-J. Kim y J. X. Kang, «A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia,» en, *Scientific Reports*, vol. 5, n.º 1, pág. 11 276, jun. de 2015.
- [651] F. Liu, A. D. Smith, G. Solano-Aguilar y col., «Mechanistic insights into the attenuation of intestinal inflammation and modulation of the gut microbiome by krill oil using in vitro and in vivo models,» *Microbiome*, vol. 8, pág. 83, jun. de 2020.
- [652] C. Menni, J. Zierer, T. Pallister y col., «Omega-3 fatty acids correlate with gut microbiome diversity and production of N-carbamylglutamate in middle aged and elderly women,» en, *Scientific Reports*, vol. 7, n.º 1, pág. 11 079, sep. de 2017.
- [653] S. K. Tankou, K. Regev, B. C. Healy y col., «A probiotic modulates the microbiome and immunity in multiple sclerosis,» en, *Annals of Neurology*, vol. 83, n.º 6, págs. 1147-1161, 2018.
- [654] T. Tsaktanis, T. Beyer, L. Nirschl y col., «Aryl Hydrocarbon Receptor Plasma Agonist Activity Correlates With Disease Activity in Progressive MS,» *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation*, vol. 8, n.º 2, e933, dic. de 2020.
- [655] A. Bessede, M. Gargaro, M. T. Pallotta y col., «Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defense pathway,» *Nature*, vol. 511, n.º 7508, págs. 184-190, jul. de 2014.
- [656] Y. Ishihara, S. Y. Kado, C. Hoeper, S. Harel y C. F. A. Vogel, «Role of NF-κB RelB in Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Ligand Specific Effects,» en, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n.º 11, pág. 2652, ene. de 2019.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [657] A. Kimura, T. Naka, K. Nohara, Y. Fujii-Kuriyama y T. Kishimoto, «Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells,» en, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, n.º 28, págs. 9721-9726, jul. de 2008.
- [658] C. F. A. Vogel, E. Sciallo, W. Li, P. Wong, G. Lazennec y F. Matsumura, «RelB, a New Partner of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Transcription,» *Molecular Endocrinology*, vol. 21, n.º 12, págs. 2941-2955, dic. de 2007.
- [659] I. Zamali, R. Rekik, N. Belhadj Hmida y col., «An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand enhances de novo generation of regulatory T cells in humans,» en, *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 105, n.º 2, págs. 291-295, 2019.
- [660] C. Esser, A. Rannug y B. Stockinger, «The aryl hydrocarbon receptor in immunity,» eng, *Trends in Immunology*, vol. 30, n.º 9, págs. 447-454, sep. de 2009.
- [661] A. Yeste, M. Nadeau, E. J. Burns, H. L. Weiner y F. J. Quintana, «Nanoparticle-mediated codelivery of myelin antigen and a tolerogenic small molecule suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis,» en, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, n.º 28, págs. 11 270-11 275, jul. de 2012.
- [662] N. Dopkins, W. Becker, K. Miranda, M. Walla, P. Nagarkatti y M. Nagarkatti, «Tryptamine Attenuates Experimental Multiple Sclerosis Through Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor,» *Frontiers in Pharmacology*, vol. 11, 2021.
- [663] S. Jangi, R. Gandhi, L. M. Cox y col., «Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis,» en, *Nature Communications*, vol. 7, n.º 1, pág. 12015, jun. de 2016.
- [664] J. L. Round y S. K. Mazmanian, «The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease,» en, *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, n.º 5, págs. 313-323, mayo de 2009.

- [665] C. C. Motran, L. Silvano, L. S. Chiapello y col., «Helminth Infections: Recognition and Modulation of the Immune Response by Innate Immune Cells,» *Frontiers in Immunology*, vol. 9, 2018.
- [666] M. Plaza-Oliver, M. J. Santander-Ortega y M. V. Lozano, «Current approaches in lipid-based nanocarriers for oral drug delivery,» eng, *Drug Delivery and Translational Research*, vol. 11, n.º 2, págs. 471-497, abr. de 2021.
- [667] J. E. Kenison, A. Jhaveri, Z. Li y col., «Tolerogenic nanoparticles suppress central nervous system inflammation,» en, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 117, n.º 50, págs. 32017-32028, dic. de 2020.
- [668] M. S. Thion, D. Low, A. Silvin y col., «Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner,» en, *Cell*, vol. 172, n.º 3, 500-516.e16, ene. de 2018.
- [669] J. Kaye, V. Piryatinsky, T. Birnberg y col., «Laquinimod arrests experimental autoimmune encephalomyelitis by activating the aryl hydrocarbon receptor,» en, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, n.º 41, E6145-E6152, oct. de 2016.
- [670] V. Rothhammer, J. E. Kenison, Z. Li y col., «Aryl Hydrocarbon Receptor Activation in Astrocytes by Laquinimod Ameliorates Autoimmune Inflammation in the CNS,» en, *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, vol. 8, n.º 2, mar. de 2021.
- [671] S. Srinivas, T. Watanabe, C. S. Lin y col., «Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus,» eng, *BMC developmental biology*, vol. 1, pág. 4, 2001.
- [672] A. Poland, D. Palen y E. Glover, «Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor,» eng, *Molecular Pharmacology*, vol. 46, n.º 5, págs. 915-921, nov. de 1994.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [673] C. Mitchell y H. Willenbring, «A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice,» en, *Nature Protocols*, vol. 3, n.º 7, págs. 1167-1170, jul. de 2008.
- [674] D. E. Sutherland, A. J. Matas, M. W. Steffes, R. L. Simmons y J. S. Najarian, «Transplantation of liver cells in an animal model of congenital enzyme deficiency disease: the Gunn rat,» eng, *Transplantation Proceedings*, vol. 9, n.º 1, págs. 317-319, mar. de 1977.
- [675] X.-w. Ding, J.-h. Wu y C.-p. Jiang, «ABCG2: A potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy,» en, *Life Sciences*, vol. 86, n.º 17, págs. 631-637, abr. de 2010.
- [676] P Garrison, K Tullis, J. Aarts, A. Brouwer y M. Denison, «Species-Specific Recombinant Cell Lines as Bioassay Systems for the Detection of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- p -dioxin-like Chemicals,» *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology*, vol. 30, págs. 194-203, mayo de 1996.

# Nomenclatura

<b>AC</b>	Adenilato Ciclasa, página 89
<b>Ado</b>	Adenosina extracelular, página 87
<b>AdoR</b>	Receptor de Ado, página 89
<b>AHR</b>	Aryl Hydrocarbon Receptor, página 1
<b>AHRR</b>	<i>AHR Repressor</i> , página 11
<b>AIP</b>	<i>AHR-Interacting Protein</i> , página 6
<b>ALA</b>	$\alpha$ -linolénico, página 90
<b>ALDH3c</b>	Aldehído deshidrogenasa citosólica, página 2
<b>ARA9</b>	<i>AHR-Associated Protein 9</i> , página 6
<b>ARNT</b>	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator, página 1
<b>BECs</b>	<i>Biliary epithelial cells</i> , página 25
<b>bHLH</b>	<i>basic-Helix-Loop-Helix</i> , página 4
<b>BP</b>	Benzo-a-pireno, página 2
<b>cAMP</b>	AMP cíclico, página 89

## NOMENCLATURA

---

<b>cDC</b>	DC clásicas, página 86
<b>Chip</b>	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i> , página 29
<b>CMH</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad, página 85
<b>CREB</b>	<i>cAMP response element binding protein</i> , página 7
<b>CRM1</b>	<i>Chromosome Region Maintenance 1</i> , página 4
<b>CRTC3</b>	Coactivador de transcripción 3 regulado por CREB, página 89
<b>CYP450</b>	Citocromos P450, página 2
<b>DAMP</b>	<i>Danger Associated Molecular Patterns</i> , página 86
<b>DC</b>	<i>Dendritic cells, DC</i> , página 82
<b>DEN</b>	<i>Dietilnitrosamina</i> , página 15
<b>DHA</b>	ácido docosahexaenoico, página 90
<b>DRE</b>	<i>Dioxin Response Elements</i> , página 7
<b>EAE</b>	Encefalitis Autoinmune Experimental, página 82
<b>EAE</b>	<i>Encefalitis Autoinmune Experimental</i> , página 15
<b>eATP</b>	ATP extracelular, página 87
<b>ECM</b>	<i>Extracelular matrix</i> , página 35
<b>EcN</b>	<i>E. coli Nissle</i> , página 111
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i> , página 33
<b>EM</b>	Esclerosis Múltiple, página 82
<b>EMT</b>	<i>Epithelial–mesenchymal transition</i> , página 13
<b>EPA</b>	ácido eicosapentaenoico, página 90
<b>ER<math>\alpha</math></b>	<i>Estrogen receptor <math>\alpha</math></i> , página 3



<b>GF</b>	<i>Growth Factor</i> , página 31
<b>GWAS</b>	<i>Genome Wide Association Study</i> , página 97
<b>HAHs</b>	<i>Halogenated Aromatic Hydrocarbons</i> , página 2
<b>HCB</b>	Hexaclorobenceno, página 29
<b>HGF</b>	<i>Hepatocyte growth factor</i> , página 33
<b>HPx</b>	<i>Hepatectomía parcial de 2/3 del hígado</i> , página 15
<b>Hsp90</b>	<i>Heat shock protein 90 kDa</i> , página 5
<b>IAA</b>	Ácido indolacético, página 82
<b>IBD</b>	<i>Inflammatory Bowel Disease</i> , página 111
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> , página 100
<b>IDO</b>	<i>Indoleamine 2,3-dioxigenase</i> , página 106
<b>IL-6</b>	<i>Interleukin-6</i> , página 33
<b>iPSC</b>	<i>induced pluripotent stem cells</i> , página 36
<b>LS/PC</b>	<i>liver stem/progenitor cells</i> , página 35
<b>LTBP-1</b>	<i>Latent Transforming Growth Factor Binding Protein-1</i> , página 3
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> , página 3
<b>MBP</b>	<i>Myelin Basic Protein</i> , página 98
<b>MEF</b>	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i> , página 9
<b>MMP</b>	<i>Matrix metalloproteinases</i> , página 35
<b>MOG</b>	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i> , página 98
<b>NES</b>	<i>Nuclear Export Signal</i> , página 4
<b>NF-KB</b>	<i>Nuclear factor-kappa B</i> , página 3

## NOMENCLATURA

---

<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i> , página 25
<b>NLS</b>	<i>Nuclear Localization Signal</i> , página 4
<b>PAHs</b>	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i> , página 2
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> , página 86
<b>PCBs</b>	<i>Polychlorinated Biphenyls</i> , página 2
<b>PCNA</b>	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> , página 49
<b>pDC</b>	DC plasmocitoides, página 86
<b>PDE2A</b>	<i>cGMP-dependent 3',5'-cyclic phosphodiesterase</i> , página 9
<b>PKA</b>	<i>Protein Kinase A</i> , página 89
<b>PKC</b>	<i>Protein Kinase C</i> , página 9
<b>PLP</b>	<i>Proteolipid Protein</i> , página 98
<b>pRb</b>	Proteína retinoblastoma fosforilad, página 3
<b>PRR</b>	<i>Pattern Recognition Receptor</i> , página 86
<b>PUFA</b>	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> , página 90
<b>PXR</b>	<i>Pregnane X Receptor</i> , página 109
<b>RIP140</b>	<i>Receptor Interacting Protein 140</i> , página 7
<b>SFB</b>	<i>Polysaccharide A</i> , página 108
<b>SFB</b>	<i>Segmented Filamentous Bacterias</i> , página 108
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i> , página 14
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central, página 82
<b>SRC</b>	<i>Steroid Receptor Coactivator</i> , página 7
<b>STAT3</b>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> , página 33

<b>TCDD</b>	2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina, página 2
<b>Teffs</b>	Células T efectoras, página 87
<b>TGF<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor beta-1</i> , página 34
<b>Th</b>	T <i>helper</i> , página 101
<b>TMEV</b>	<i>Theiler's murine encephalomyelitis virus</i> , página 103
<b>Treg</b>	Células T reguladoras, página 82
<b>Tregs</b>	Células T reguladoras, página 87
<b>UGT1*06</b>	UDP glucuronosiltransferasa-1, página 2
<b>uPA</b>	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i> , página 35
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i> , página 100
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , página 13
<b>XAP2</b>	<i>Hepatitis B virus X-Associated Protein 2</i> , página 6
<b>XRE</b>	<i>Xenobiotic Response Elements</i> , página 7