

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Modulación del perfil transcripcional y funcional de macrófagos humanos por el receptor de serotonina 5-HT_{2b} y el factor de transcripción AhR

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ignacio Rayo Hernández

DIRECTORES

Ángel Luis Corbi Lopez
Concepción Nieto Mazarrón

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

MODULACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL
Y FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS HUMANOS
POR EL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT_{2B} Y EL
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AhR

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ignacio Rayo Hernández

DIRECTOR

Ángel Luis Corbi Lopez

Concepción Nieto Mazarrón

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular



MODULACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL
Y FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS HUMANOS
POR EL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT_{2B} Y EL
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AhR

Ignacio Rayo Hernández

DIRECTOR

Ángel Luis Corbi Lopez

Concepción Nieto Mazarrón

Gracias a mis padres, por dárme todo

A mis hermanos, por soportarme

Gracias a mi mujer Tamara, por quererme y no matarme mientras escribía la tesis

*This PHD is dedicated
To all the teachers that told me I'd never amount to nothing'
You know what I'm saying?
It's all good*

Notorious B.I.G, Juicy, 1994.

*C'est l'histoire d'un homme qui tombe dans un immeuble de 50 étages.
Au-delà de la mesure, il se répète sans cesse: «Jusqu'ici tout va bien... Jusqu'ici tout
va bien... Jusqu'ici tout va bien. »
Mais l'important, c'est pas la chute. C'est l'atterrissage.*

La haine, 1995

ÍNDICE

ABREVIATURAS	II
ABSTRACT	15
RESUMEN	16
INTRODUCCIÓN	19
1. Macrófagos: Células esenciales en la modulación de la respuesta inmunitaria innata	21
1.1 Ontogenia del Macrófago	21
1.2 Macrófagos residentes de tejido.....	22
1.3 Macrófagos en inflamación	26
1.4 Activación del macrófago.....	28
2. Serotonina, más que un neurotransmisor	30
2.1 Serotonina periférica	30
2.2 Serotonina en el sistema inmune	30
2.3 Receptores de serotonina	33
2.4 5-HT _{2B} : Expresión y señalización intracelular	34
3. Receptor de Aryl Hidrocarburos (AhR)	39
3.1 Estructura y función	39
3.2 Mecanismos de funcionamiento.....	39
3.3 Papel en el sistema inmune	41
3.4 AhR en macrófagos	42
OBJETIVOS	46
HIPÓTESIS	50
RESULTADOS CAPÍTULO I:	
El agonista del receptor de serotonina 5-HT _{2B} BW723C86 configura el perfil génico de macrófagos a través de AhR e interfiere en la generación de osteoclastos a partir de monocitos humanos.....	54
5-HT modula el perfil génico dependiente de AhR en macrófagos humanos M-MØ a través de 5-HT _{2B}	56
El agonista de 5-HT _{2B} BW723C86 modifica la expresión de genes diana de AhR.....	57
BW723C86 modula el efecto del LPS sobre el perfil génico y la producción de citoquinas de macrófagos M-MØ.....	59
BW723C86 promueve la activación transcripcional de AhR en macrófagos humanos	60
BW723C86 también induce la activación transcripcional de AhR en la línea de hepatocarcinoma humano HepG2.....	61
Análisis del perfil génico de macrófagos derivados de precursores de médula ósea procedentes de ratones Htr2b KO.....	61
Los ligandos de 5-HT _{2B} ACS y 6-APB también aumentan la expresión de genes diana de AhR en M-MØ.....	62
Análisis de las vías de señalización que median el efecto de 5-HT _{2B} sobre la activación de AhR.....	62
Efectos de BW723C86 independientes de 5-HT _{2B} : bloqueo de la diferenciación de osteoclastos.....	63
RESULTADOS CAPÍTULO II:	
Papel de AhR en la diferenciación de macrófagos anti-inflamatorios M-MØ humanos	68
La inhibición de AhR perjudica la adquisición de la firma transcripcional de M-MØ anti-inflamatorios.....	70
La inhibición de AhR impide la adquisición del perfil de citoquinas característico de M-MØ anti-inflamatorios.....	72
Análisis del perfil génico de macrófagos derivados de precursores de médula ósea procedentes de ratones AhR KO.....	73
La inhibición de AhR produce M-MØ con actividad inhibitoria del crecimiento de células tumorales potenciada.....	73

<i>La inhibición de AhR produce M-MØ con metabolismo energético alterado</i>	74
<i>Los cambios transcripcionales propiciados por la inhibición crónica de AhR están mediados en parte por LXRα</i>	76
<i>Estudio del perfil transcriptómico en pacientes del síndrome Von Hippel Lindau</i>	77
DISCUSIÓN	82
<i>5-HT_{2B} y su papel en M-MØ</i>	84
<i>AhR como factor esencial en macrófagos humanos M-MØ anti-inflamatorios</i>	87
PUBLICACIONES	94
AVANCES	94
CONCLUSIONES	98
MATERIALES Y MÉTODOS	102
INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	110
REFERENCIAS	116

ABREVIATURAS

5-HT: 5 Hydroxy triptamine	IRAK: Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
5-HT _{2B} : Serotonin receptor 2B	IRF: Interferon regulatory factors
AhR: Aryl hydrocarbon receptor	JNK: c-Jun N-terminal kinase
AIP: AhR-interacting protein	LPS: Lipopolysaccharide
AMP: Adenosine monophosphate	LXR: Liver X receptor
AMS: Alpha-methyl-serotonin	MAF: Musculoaponeurotic fibrosarcoma protein
ARNT: Aryl hydrocarbon receptor transporter	MAL: MyD88 adapter-like protein
BHLH-PAS: Basic helix-loop-helix- PER-ARNT-SIM protein family	MAPK: Mitogen-activated protein kinase
CD: Cluster of differentiation	M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor
CSF1R: Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor (M-CSF)	MHC: Major histocompatibility complex
CSF2R: Macrophage colony-stimulating factor 2 receptor (GM-CSF)	MITF: Melanocyte inducing transcription factor
CTL: C type lectin	M-MØ: M-CSF polarized macrophages
DAMP: Damage-associated molecular patterns	MMP: Matrix metallopeptidases
DFOA: Deferoxamine	MYD88: Myeloid differentiation primary response 88
DMSO: Dimethyl sulfoxide	NFATC1: Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1
EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis	NF-κB: Nuclear factor kappa B
EGF: Epidermal growth factor	p38: P38 mitogen-activated protein kinase
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay	PAH: Pulmonary arterial hypertension
ERK: Extracellular signal-regulated kinase	PAMP: Pathogen-associated molecular pattern
VHL: Von Hippel Lindau disease	PBMC: Peripheral blood mononuclear cell
FDR: False discovery rate	PDGF: Platelet-derived growth factor
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.	PKA: Protein kinase A
GM-MØ: GM-CSF polarized macrophages	PLC: Phosphoinositide phospholipase C
GSEA: Gene Set Enrichment Analysis	PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptors
HIF: Hypoxia-inducible factor	PRR: Pattern recognition receptor
HSP: Heat Shock Protein	pVHL: Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor protein
5-HT _x : Serotonin receptor	qRT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction
IFN: Interferon	RANKL: Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
IL: Interleukin	RPMI: Roswell Park memorial Institute medium
	SARM: Sterile-alpha and Armadillo repeat protein

SERT: Serotonin transporter

SIM: Single-Minded Family BHLH Transcription Factor 1

SiRNA: small interfering RNA

SLC40A1: Solute Carrier Family 40 Member 1

CNS: Central Nervous System

SOCS: Suppressor of cytokine signalling

SRC: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

TCDD: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin

TGF: Transforming growth factor

Th: T Helper cell

TIR: Toll/interleukin-1 receptor

TLR: Toll like receptor

Tr1: Type 1 regulatory T cells

TNF: Tumor necrosis factor

TPH: Tryptophan hydroxylase

TRAF: TNF receptor-associated factor 1

TRAP: Tartrate-resistant acid phosphatase

Treg: Regulatory T-Cell

TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

VEGF: Vascular endothelial growth factor

WT: Wild type

XRE: Xenobiotic response element

ABSTRACT

Macrophages are cells of the innate immune system able to acquire a broad phenotypic and functional range (polarization). This feature allows them to adapt to the requirements of the microenvironment. The range of macrophage polarization states is dictated by extracellular signals, their ontogeny and the activating stimuli from the environment. This versatility allows them to be involved in the maintenance of homeostasis, participating in the elimination of pathogens, tissue repair, wound healing, and in the initiation and resolution of inflammatory responses. Therefore, knowledge of the molecular basis of macrophage polarization is an intermediate step for the development of therapeutic strategies for pathologies derived from, or associated with, an altered or deregulated macrophage polarization, such as rheumatoid arthritis, atherosclerosis, cancer, multiple sclerosis, etc... As critical regulators of inflammatory processes, macrophages are the target of numerous agents and molecules with pro- or anti-inflammatory activities. One of them is peripheral serotonin (5-HT), a biogenic amine that has a plethora of functions, including its well-known role as neurotransmitter.

Beyond its function in the central nervous system, 5-HT plays a key role in numerous biological processes, including embryonic development, vasoconstriction, angiogenesis, temperature control, liver regeneration, mammary gland development, osteoclastogenesis, inflammation and fibrosis. Peripheral 5-HT is produced by enterochromaffin cells in the intestine and released into the bloodstream, where it is recognized and internalized by platelets. After an insult or damage, platelets release 5-HT that performs its peripheral functions as a hormone.

Serotonin's ability to regulate physiological functions derives from its recognition by seven different types of receptors (5-HT₁₋₇). 5-HT is capable of regulating macrophages anti-inflammatory or pro-fibrotic polarization through the axis mediated by 5-HT₇ and protein kinase A (PKA). However, anti-inflammatory macrophages are also characterized by the expression of 5-HT_{2B}, a target of anesthetics and antidepressants and whose altered function triggers cardiac pathologies.

In order to elucidate the role of 5-HT_{2B} in macrophages, the transcriptional and functional effects of the agonist BW723C86 have been determined. Our results revealed changes in the cytokine production profile and modifications in the gene signature of macrophages caused by the activation of 5-HT_{2B}. A significant fraction of these changes was found to be mediated by the Aryl hydrocarbon receptor (AhR) transcription factor, a key molecule for the detection and management of xenobiotics. Our results have brought to light the existence of a 5-HT_{2B}-AhR functional axis in human macrophages, which broadens the range of the signaling pathways initiated after activation of the 5-HT_{2B} receptor, and identified a convergence point for recognition of endogenous and exogenous agents with the ability to modulate inflammatory responses. On the other hand, we have identified the existence of changes induced by the agonist BW723C86 that are independent of its interaction with 5-HT_{2B}. In this sense, we have determined that BW723C86 impairs the differentiation of monocytes to osteoclasts, preventing the acquisition of essential genes in the osteoclastogenesis process.

Finally, we have dissected the role of the AhR transcriptional factor in the differentiation of human macrophages in response to M-CSF (M-MØ). Based on the positive enrichment of AhR-regulated genes in the transcriptional profile of M-MØ, and through the use of the AhR inhibitor CH-223191, we have shown that AhR contributes to the acquisition of M-MØ-specific gene and cytokine profiles. Additionally, we have found that inhibition of AhR determines a switch in the bioenergetics profile of macrophages, increasing the glycolytic activity that characterizes pro-inflammatory macrophages. This set of results has led us to the conclusion that the AhR transcription factor decisively contributes to the acquisition of the specific properties of M-MØ anti-inflammatory macrophages.

RESUMEN

Los macrófagos son células del sistema inmune innato con la capacidad de adquirir una amplia heterogeneidad fenotípica y funcional (polarización), lo que les permite adaptarse a los requerimientos del microambiente en el que se encuentran. El abanico de estados de polarización de macrófagos viene dictado por señales extracelulares, por su ontogenia y por los estímulos activadores procedentes del medio. Dicha versatilidad les permite estar implicados en el mantenimiento de la homeostasis, al participar en la eliminación de patógenos, la reparación tisular, la cicatrización de heridas y la iniciación y resolución de respuestas inflamatorias. Por todo ello, resulta capital el conocimiento de las bases moleculares de la polarización de macrófagos como paso intermedio para el desarrollo de estrategias terapéuticas frente a patologías derivadas de, o asociadas con, una polarización de macrófagos alterada o desregulada (artritis reumatoide, aterosclerosis, cáncer, esclerosis múltiple, etc...).

Como reguladores críticos de los procesos inflamatorios, los macrófagos son objetivo de numerosos agentes y moléculas con actividades pro- o anti-inflamatorias, siendo una de ellas la serotonina periférica (5-HT). La serotonina es una amina biogénica que presenta diferentes funciones, siendo la más conocida la de neurotransmisor. Más allá de esta función en el sistema nervioso central, se sabe que 5-HT juega un papel capital en distintos procesos biológicos (desarrollo embrionario, vasoconstricción, angiogénesis, control de la temperatura, regeneración del hígado, desarrollo de la glándula mamaria, osteoclastogénesis, inflamación y fibrosis). La serotonina periférica es producida por las células enterocromafinas del intestino y liberada al torrente sanguíneo, donde es reconocida e internalizada por las plaquetas. Ante un insulto o daño, las plaquetas procederán a su liberación, permitiendo que la 5-HT lleve a cabo sus funciones periféricas como hormona.

La capacidad de 5-HT de regular funciones fisiológicas deriva de su reconocimiento por siete tipos diferentes de receptores (5-HT₁₋₇). En macrófagos, la serotonina es capaz de regular la polarización anti-inflamatoria o pro-fibrótica a través del eje mediado por el receptor 5-HT₇ y la proteína Quinasa A (PKA). Sin embargo, los macrófagos anti-inflamatorios también se caracterizan por la expresión del receptor de serotonina 5-HT_{2B}, cuya función alterada desencadena patologías cardíacas y que es diana de anestésicos y antidepresivos.

Con objeto de elucidar el rol de 5-HT_{2B} en macrófagos, se ha determinado el efecto transcripcional y funcional de su agonista selectivo BW723C86, lo que ha permitido poner de manifiesto los cambios en el perfil de producción de citoquinas y las modificaciones en la firma génica de macrófagos causadas por la activación de 5-HT_{2B}. Una fracción significativa de dichos cambios está mediada por el factor transcripcional AhR o receptor de aril hidrocarburos, molécula esencial para la detección y procesamiento de xenobióticos. Nuestros resultados han puesto de manifiesto la existencia de un eje funcional 5-HT_{2B}-AhR en macrófagos humanos, lo que amplía el rango de rutas de señalización iniciadas tras la activación del receptor 5-HT_{2B} e identifica un punto de convergencia del reconocimiento de agentes endógenos y exógenos con capacidad de modular respuestas inflamatorias. Por otra parte, hemos identificado la existencia de cambios inducidos por el agonista BW723C86 que son independientes de su interacción con 5-HT_{2B}. En este sentido, se ha determinado que BW723C86 previene la diferenciación de monocitos a osteoclastos, impidiendo la adquisición de genes esenciales en el proceso de osteoclastogénesis.

Finalmente, hemos diseccionado el papel del factor transcripcional AhR en la diferenciación de macrófagos humanos derivados de monocitos en respuesta a M-CSF (M-MØ). Tomando como base el enriquecimiento de genes regulados por AhR en el perfil transcripcional de macrófagos M-MØ, y mediante el empleo del inhibidor de AhR CH-223191, hemos demostrado que AhR contribuye a la adquisición de genes específicos de M-MØ y del perfil de citoquinas característico de macrófagos anti-inflamatorios. Por ende, la inhibición de AhR determina un cambio en el perfil bioenergético de los macrófagos, haciendo que aumente la actividad glicolítica que caracteriza a los macrófagos pro-inflamatorios. Este conjunto de resultados nos ha llevado a la conclusión de que el factor de transcripción AhR contribuye de manera decisiva a la adquisición de las propiedades específicas de macrófagos anti-inflamatorios.

INTRODUCCIÓN

1. Macrófagos: Células esenciales en la modulación de la respuesta inmunitaria innata.

1.1 Ontogenia del Macrófago.

El término Macrófago (del griego; macros: grande y fagos; comedor), originalmente acuñado por Metchnikoff, sirvió para nombrar por primera vez a un tipo de células caracterizadas por su naturaleza fagocítica¹⁻². Metchnikoff describió su papel en distintos procesos biológicos, como el desarrollo de órganos o la protección contra infecciones. Así mismo, fue el primero en hacer referencia a la existencia de una conexión entre las células fagocíticas mononucleares que se encontraban en la médula ósea, el bazo y los ganglios y el resto, que se disponían fuera de dichas estructuras¹⁻³. Para la clasificación de estas células se han empleado diversas nomenclaturas, siendo la más aceptada la del “Sistema fagocítico mononuclear”, acuñado en 1972 por van Furth y colaboradores, y que incluye a todas las células mononucleares altamente fagocíticas y sus progenitores de la médula ósea. Según las ideas de van Furth, estas células mononucleares derivan de células madre de médula ósea, viajan como monocitos de sangre periférica, y se infiltran posteriormente en los tejidos, donde se diferencian a macrófagos sin capacidad de proliferación^{4,5}.

Este modelo de diferenciación de monocito a macrófago en tejido ha sido redefinido recientemente, aunque se mantiene en el caso de la respuesta inflamatoria y en tejidos como el corazón o el intestino⁵. Dicha redefinición deriva de la identificación de progenitores de macrófagos residentes en tejido, originados en el saco vitelino, eliminando la necesidad de un progenitor monocítico derivado de médula ósea en los primeros momentos de su ontogenia. Por tanto, actualmente se propone que existen tres orígenes para los precursores de los macrófagos tisulares: progenitores embrionarios del saco vitelino, monocitos del hígado fetal, y monocitos derivados de médula ósea.

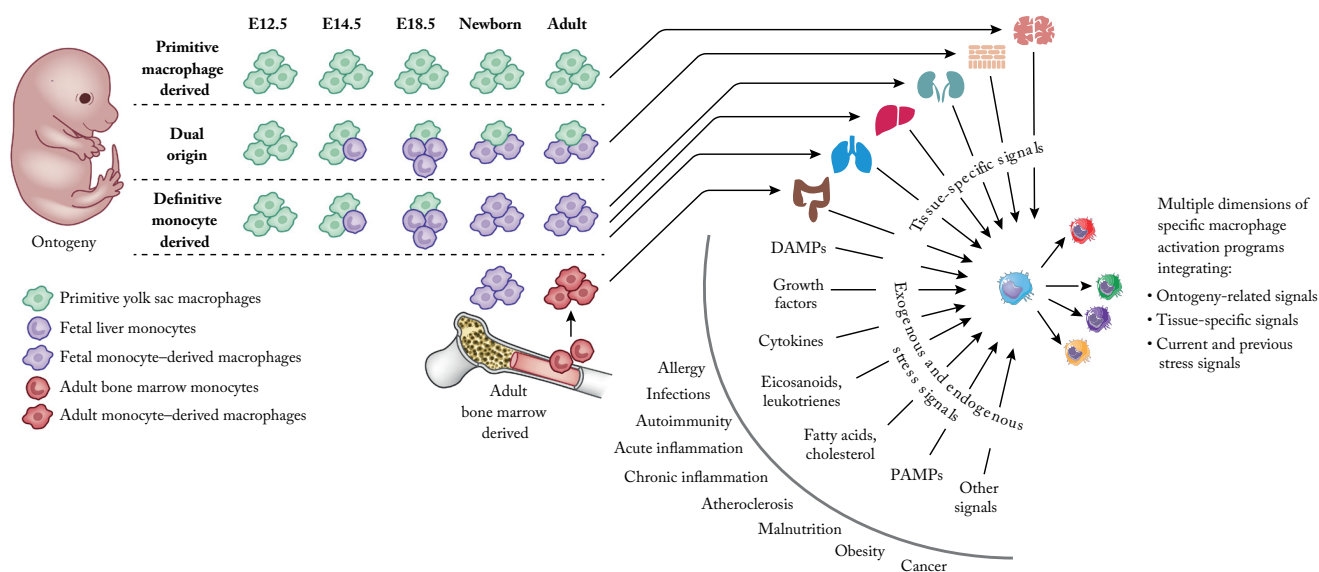


Figura 1. Modelo multidimensional de la activación del macrófago. Modelo multidimensional de la activación del macrófago en el que la ontogenia, el microambiente del tejido y las señales de estrés (debido a daño del tejido) interactúan para generar una respuesta de activación del macrófago concreta. Los macrófagos residentes de tejidos pueden derivar de precursores del saco vitelino (microglía del cerebro), de monocitos hepáticos fetales (macrófagos alveolares y células de Kupffer en el hígado), o tener un origen mixto (Células de Langerhans). Tras el nacimiento, los macrófagos derivan de progenitores de médula ósea en el caso de los macrófagos intestinales, cardíacos y dérmicos. Además, las señales ambientales específicas del tejido determinan el estado de polarización en homeostasis. Ante un daño tisular, las señales de estrés se elevan en el tejido, modificando el programa de activación del macrófago. “E” significa días de desarrollo embrionario. Adaptada de ¹².

El saco vitelino presenta progenitores eritromieloides (EMP) que son los precursores embrionarios de los macrófagos del propio saco vitelino y de los monocitos fetales^{6,7}. Es conocido que existen dos ondas secuenciales de EMP: una onda temprana independiente de c-Myb, que genera macrófagos primitivos sin intermediarios monocíticos en el saco vitelino, y una onda tardía que es dependiente de c-Myb, que siembra el hígado fetal





para generar múltiples linajes hematopoyéticos y que incluye a los monocitos fetales⁷.

En cuanto a los monocitos derivados del hígado fetal, se sabe que, además de estos EMP, también derivan de las células madre hematopoyéticas clásicas⁸. Los monocitos procedentes del hígado fetal se diferencian en macrófagos tras el reclutamiento a los tejidos fetales⁷, diluyendo la población pre-existente de macrófagos derivados del saco vitelino y dando lugar a la mayoría de los macrófagos tisulares en el adulto, con la excepción de la microglía. Tras el nacimiento, y coincidiendo con la formación de hueso, el proceso de hematopoyesis en el hígado disminuye y se ve reemplazado por la hematopoyesis en la médula ósea^{9,10}.

Existen puntualizaciones al modelo fagocítico anteriormente descrito, que indicamos a continuación. Los macrófagos de la epidermis, así como las células de Langerhans, derivan tanto del hígado fetal como del saco vitelino¹⁰. La microglía deriva exclusivamente de los progenitores del saco vitelino¹⁰. En cuanto a los macrófagos pulmonares, se han descrito tres olas de macrófagos que colonizan el pulmón en distintas etapas del desarrollo. Una primera ola de precursores con origen en el saco vitelino, una segunda ola desde el hígado fetal y, finalmente, una tercera ola procedente de médula ósea, que da lugar a los macrófagos intersticiales “definitivos” que pueblan el intersticio pulmonar, reemplazando la población del linaje embrionario, y que son mantenidos por los progenitores circulantes (monocitos)¹¹. Es destacable también como, en condiciones de homeostasis, en la dermis, el intestino y el corazón, ocurre un proceso donde los monocitos siembran el tejido y se diferencian en macrófagos tisulares⁴. Este proceso solo tiene lugar en el resto de tejidos cuando se activa la respuesta inflamatoria, ante una señal de daño o patogénica¹².

1.2 Macrófagos residentes de tejido.

La alta plasticidad de los macrófagos les permite adaptarse a diferentes entornos tisulares, donde juegan un papel clave en la respuesta inmunitaria contra patógenos, además de presentar la capacidad de iniciar y resolver procesos inflamatorios o regular la cicatrización de heridas. Así mismo, los macrófagos participan en el desarrollo del tejido, moldeando la arquitectura del mismo, y depurando la presencia de células apoptóticas, todo ello dentro de su papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis del tejido¹³. Para llevar a cabo todas estas funciones, e independientemente de su origen, los macrófagos continuamente detectan señales extracelulares (estímulos exógenos, metabolitos y citoquinas), lo que les hace reajustar su perfil génico y sus capacidades funcionales de manera tejido- y estímulo-específica. A continuación (Tabla 1) se muestran los diferentes macrófagos tisulares, sus marcadores característicos, así como sus funciones más características y las patologías con las que están relacionados.

				
	Microglia	Alveolar MØ	Cardiac MØ	Kupffer Cell
Specific markers	F4/80+ CD11b+ CD45low IRF8 Smads	F4/80low CD11b low CD11c hig. CD68+ Siglec F+ MARCO+ CD206+ Dectin-1+ Galectin-3+ (PPARγ) BACH2	HTR2B?	F4/80hig CD11blow CD169+ CD68+ Galectin-3+ CD80lo/- PPARδ
Homeostatic function	Neuronal survival Immunological surveillance Elimination of dead neurons Synaptic remodeling	Immunological surveillance Search for inhaled pathogens Surfactant Removal	Phagocytosis of dead cardiomyocytes	Elimination of microorganisms, blood cell debris and aged red blood cells
Pathology	Neurodegeneration	Pulmonary alveolar proteinosis	Enfermedad isquémica del corazón	Fibrosis

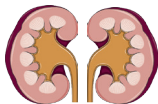



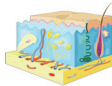
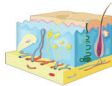
	 Red pulp MØ	 Metallophilic	 Marginal zone MØ	 Osteoclast	 Skin	 Langerhans cells
Specific markers	CF4/80+ CD206+ Dectin-2+ Spi-C	CD68+ CD169+ LXRα	CD68+ CD209b+ MARCO+ Dectin-2+ Tim4+ LXRα	Calcitonin receptor+ NFATC1 FOS MITF	F4/80+ CD11b+ CD11clow CD206+ MHCIIlow CD169+ Dectin-1 CD301+ Dectin-2+	CF4/80+ CD206+ Dectin-2+ Spi-C
Homeostatic function	Erythrocyte clearance iron metabolism	Immune survival	Immune monitoring of the circulation	Bone resorption for disruption of the mineralized matrix	Immune surveillance Wound healing	Interaction with T cells Antigen presentation
Pathology	Immune thrombocytopenia (ITP) Autoimmune hemolytic anemia (AIHA)		Autoimmune diseases	Osteoporosis Osteopetrosis Tumores de hueso Enfermedad de Paget	Fibrosis	Immune surveillance

Tabla 1. Macrófagos residentes de tejido: marcadores específicos, funciones y patologías relacionadas. Adaptada de ⁴.

Tras diferenciarse, los macrófagos desempeñan funciones efectoras de manera tejido-específica para controlar la homeostasis tisular, mientras que la desregulación de su diferenciación o actividad da lugar, o se asocia, a situaciones patológicas. En los pulmones, por ejemplo, los macrófagos alveolares están especializados en el reciclado del surfactante pulmonar, y su incorrecto funcionamiento (por ausencia de señales procedentes del receptor de GM-CSF) causa la proteinosis alveolar pulmonar (PAP)¹⁴. En el tejido adiposo, donde los macrófagos son clave en la regulación de la sensibilidad a la insulina por los adipocitos, la producción aumentada de citoquinas pro-inflamatorias por macrófagos se asocia a la obesidad y la resistencia a la insulina¹⁵. Por otro lado, y en el caso del tejido óseo, los osteoclastos son los encargados de reabsorber el hueso y mantener la integridad ósea y los niveles de calcio en equilibrio con las acciones de los osteoblastos. En este caso, el fracaso en la formación de osteoclastos, como la que tiene lugar en la cepa de ratones *Csf op/op*, conduce a una arquitectura ósea aberrante y osteopetrosis, con huesos que carecen de las cavidades necesarias para la hematopoyesis de la médula ósea¹⁶.

De manera general, los macrófagos tisulares se caracterizan por marcadores de superficie celular como la tirosina-proteína quinasa MER (MERTK) y FcγRI (CD64) junto con la expresión de los factores de transcripción como PU.1, C/EBPα, MAF y MAFB. Sin embargo, existen citoquinas y metabolitos producidos en el microambiente tisular que promueven la expresión de factores de transcripción y marcadores tejido-específicos. De todas las señales detectadas por los progenitores de macrófagos, y por su papel crítico en la diferenciación a macrófagos específicos de tejido, destacan las indicadas a continuación¹⁷.

M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor).

M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), o Colony-Stimulating Factor 1 (CSF-1), es una glicoproteína dimérica con enlaces disulfuro y un peso molecular de 70 kDa. Recibe su nombre al haber sido el primero de los CSFs (Colony-Stimulating Factor) en ser purificado¹⁸ y en mostrar capacidad para estimular la formación de colonias de macrófagos¹⁹.

M-CSF se produce constitutivamente por una gran variedad de células, como células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos, células del músculo liso y macrófagos, pudiéndose detectarse concentraciones de hasta 10 ng/ml en plasma^{20,21}. En situaciones patológicas (cáncer, inflamación y trastornos autoinmunes) ocurre un aumento exacerbado de los niveles circulantes de M-CSF²²⁻²⁴, que también se incrementa durante el embarazo, donde contribuye al desarrollo placentario²⁵. Además se ha demostrado que CSF1-R, receptor de M-CSF, se expresa en neuronas y células endoteliales capilares del SNC, donde proporciona señales neuroprotectoras y de supervivencia en respuesta a lesiones cerebrales y neurodegeneración²⁶. En condiciones homeostáticas, el

nivel de M-CSF se regula mediante endocitosis mediada por CSF1-R y su posterior degradación intracelular²⁷. Existen 3 isoformas biológicamente activas de esta molécula:

- I. sgCSF-1: glicoproteína secretada.
- II. spCSF-1: proteoglicano secretado.
- III. csCSF-1: glicoproteína de superficie celular.

El CSF-1 circulante (spCSF-1 y sgCSF-1) es producido principalmente por las células endoteliales y mantiene selectivamente ciertas poblaciones de macrófagos, incluidas las células de Kupffer²⁸. La síntesis local de csCSF-1 es suficiente para la regulación de varias poblaciones de macrófagos tisulares²⁹.

Funciones.

Los primeros estudios in vitro demostraron que las células precursoras de médula ósea (monocitos) cultivados con M-CSF generaban colonias de macrófagos. Debido a estas observaciones, inicialmente se pensó que M-CSF impulsa un programa de diferenciación de macrófagos y es esencial para la generación in vivo de macrófagos a partir de precursores de médula ósea. Estudios posteriores llevados a cabo en el ratón *Csf1*^{op/op} (que tiene una mutación natural en el locus *Csf1*) revelaron que el número de monocitos sanguíneos en dicha cepa es normal²⁹ mientras que las funciones y el número de varias poblaciones de macrófagos tisulares están alteradas^{30,31}. Los ratones *Csf1*^{op/op} presentan una reducción drástica en los macrófagos de la cavidad peritoneal, el riñón, el hígado y la dermis³². En línea con estos datos, la administración in vivo de M-CSF recombinante causa la expansión del sistema de fagocitos mononucleares, con un aumento sustancial (de hasta 10 veces) en el número de monocitos sanguíneos, así como un gran aumento paralelo en el número de macrófagos residentes³³. Además, la deficiencia de M-CSF causa la osteopetrosis (como resultado de la producción deficiente de osteoclastos que reabsorben los huesos), anomalías en el sistema nervioso central y defectos en las funciones reproductivas^{34,35}.

El receptor de M-CSF.

Las actividades biológicas de M-CSF están mediadas por la señalización a través del receptor transmembrana tirosina quinasa de tipo III, conocido como CSF1-R (Colony-Stimulating Factor 1 receptor), codificado por el protooncogen *c-fms*^{32,36}. La unión de M-CSF a CSF1-R conduce a la dimerización del receptor, su autofosforilación, la activación de PI3K, ERK y fosfolipasa C (PLC), y la posterior localización nuclear del factor de transcripción Sp1^{36,37} (Fig. 2, panel izquierdo). En humanos, mutaciones en CSF1-R se han asociado con leuco-encefalopatía difusa hereditaria, desarrollo de leucemia mieloide aguda y síndromes mielodisplásicos^{38,39}.

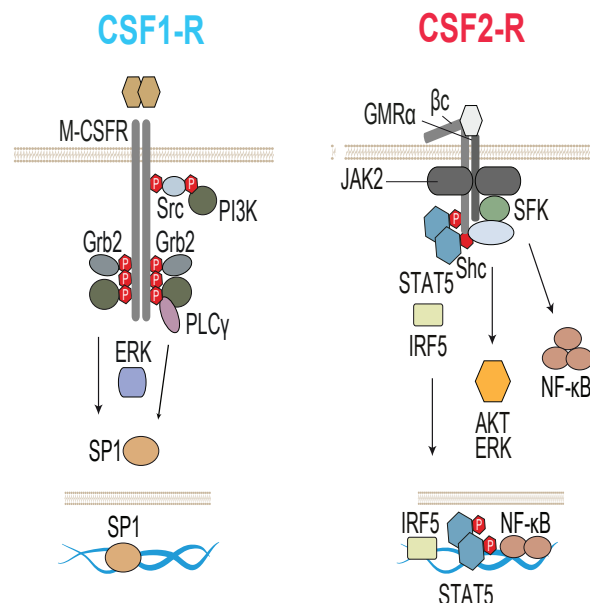


Figura 2. Representación gráfica de los receptores de M-CSF (CSF1-R) y GM-CSF (CSF2-R). Adaptada de ³⁷.

M-CSF y su papel en patologías.

M-CSF juega un papel claro en el desarrollo de una amplia gama de patologías. Se han observado niveles aumentados de M-CSF circulante en artritis, inflamación renal, fibrosis pulmonar, obesidad, enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer (metástasis)^{21,40}. De acuerdo con esto, la neutralización de M-CSF y/o el bloqueo de CSF1-R reducen la patología en modelos animales de inflamación y autoinmunidad, y en modelos de metástasis tumoral en ratón⁴¹. M-CSF tiene un papel crítico en la progresión de los macrófagos asociados a tumor (TAM) y la metástasis. M-CSF promueve el reclutamiento de macrófagos a través de la inducción de la producción de CCL2, que recluta monocitos a los sitios de inflamación⁴². Además, M-CSF apoya la supervivencia y la polarización de macrófagos asociados a tumores^{43,44}, que promueven el desarrollo de tumores mediante la secreción de factores de crecimiento y pro-angiogénicos, la producción de citoquinas inmunosupresoras y la inhibición de las funciones efectoras de las células T⁴⁵. La alta expresión de M-CSF y la presencia de macrófagos positivos para CSF1-R en tumores se han observado en múltiples tipos de tumores y se correlacionan con un mal pronóstico^{23,46}. Estas observaciones indican que el eje constituido por M-CSF y su receptor CSF1-R, es un objetivo terapéutico atractivo en cáncer. De hecho, la inhibición de CSF1-R ha generado resultados prometedores en modelos murinos de cáncer, incluidos los modelos de glioma, tumor pancreático, cáncer cervical y mamario^{47,48}, lo que ha llevado a la realización de ensayos clínicos con inhibidores del eje M-CSF/CSF1-R. El bloqueo del eje M-CSF/CSF1-R con inhibidores específicos ha mostrado un beneficio terapéutico mínimo en glioblastoma, causando un retraso en el crecimiento del tumor⁴⁹. Por otra parte, el bloqueo de CSF1-R no ha mostrado eficacia clínica en patologías autoinmunes como la artritis reumatoide⁵⁰.

IL-34

La IL-34, como el M-CSF, señala a través de CSF1-R. La expresión de IL-34 se restringe a cerebro y epidermis, donde es producido por las neuronas y los queratinocitos. IL-34 es responsable de la diferenciación de la microglía, mientras que induce la expresión de RUNX3 e ID2, y promueve la diferenciación de las células de Langerhans en colaboración con TGF- β ⁵¹.

RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand).

RANKL es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Junto con M-CSF, RANKL promueve la diferenciación de macrófagos a osteoclastos, macrófagos residentes en el hueso y especializados en su degradación. El RANKL derivado de osteoblastos y el M-CSF regulan positivamente la expresión de NFATc1, MITE, FOS y NF κ B, todas ellas esenciales para la fusión celular y la generación de osteoclastos maduros^{52,53}.

GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor).

GM-CSF es una glicoproteína ácida con un peso molecular de 23 kDa, que cuenta con enlaces disulfuro internos. A diferencia del M-CSF, GM-CSF presenta niveles circulantes basales bajos en condiciones homeostáticas, pero sus niveles pueden elevarse rápidamente durante una infección o inflamación⁵⁴. GM-CSF se produce durante reacciones inflamatorias/autoinmunes por una gran variedad de células, incluidos fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, células dendríticas, células T, neutrófilos y eosinófilos⁵⁵.

La expresión de GM-CSF es inducida por citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 α , IL-1 β , TNF, e IL-12, mientras que IL-4, IFN- γ e IL-10 la suprimen⁵⁶. En los sitios de inflamación, GM-CSF tiene efectos pro-inflamatorios mediante el reclutamiento y la promoción de la supervivencia y la activación de células mieloides^{57,58}. En modelos murinos de autoinmunidad/inflamación, el bloqueo de GM-CSF reduce el reclutamiento de monocitos y neutrófilos con el correspondiente alivio de la gravedad de la enfermedad, mientras que la administración in vivo de GM-CSF moviliza monocitos desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo^{59,60}. Estas observaciones contrastan con el papel "homeostático" de M-CSF, ya que GM-CSF no solo promueve la supervivencia de los macrófagos, sino que también apoya su diferenciación hacia un fenotipo pro-inflamatorio. De hecho, GM-CSF desplaza el fenotipo de los macrófagos en una dirección pro-inflama-

toria, y promueve la inducción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF, IL-6, IL-12p70, IL-23 e IL-1 β , y de quimioquinas como CCL22, CCL24, CCL5 y CCL1, que promueven el reclutamiento de leucocitos^{61,62}.

El receptor de GM-CSF.

GM-CSF señala a través de su receptor CSF2-R, integrado por una subunidad de unión a ligando (CSF2-R α) y una subunidad de transducción de señal común con IL-5 e IL-3 (CSF2-R β c)^{63,64}. Además de compartir una subunidad de receptor común, los genes que codifican a IL-3, IL-5 y GM-CSF se encuentran muy cerca en el cromosoma 5 humano, lo que refleja un origen evolutivo común⁶⁵. La unión de GM-CSF a CSF2-R desencadena la estimulación de múltiples vías de señalización, incluidas las de JAK2/STAT5, MAPK y PI3K⁶⁶⁻⁶⁸.

GM-CSF y su rol en patologías.

Aunque prescindible para el desarrollo y mantenimiento de los tipos de células hematopoyéticas más importantes en sangre y médula ósea, GM-CSF desempeña un papel importante en la inducción de numerosas funciones efectoras de células inmunitarias, incluida la estimulación de la proliferación y activación de monocitos/macrófagos, células dendríticas, células T, neutrófilos y células B⁶⁹. Los ratones que carecen de GM-CSF son más susceptibles a infecciones pulmonares^{70,71} e intestinales⁷². Aunque la producción de GM-CSF en células T a menudo se asocia con células Th17, los linfocitos Th1, Th2 y CD8⁺ también producen GM-CSF tras la activación⁷³⁻⁷⁵. La expresión de GM-CSF por las células T está aumentada por las citoquinas inflamatorias IL-6, TNF e IL-23, mientras que IL-10, IL-4 e IL-27 la inhiben^{76,77}. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ de ratones deficientes en GM-CSF también exhiben respuestas proliferativas alteradas y funciones efectoras deterioradas⁷⁸. En cambio, el GM-CSF derivado de las células T promueve la maduración y activación de células presentadoras de antígeno, que a su vez potencian las funciones celulares de linfocitos T⁷⁹⁻⁸¹. De hecho, los estudios con ratones deficientes en GM-CSF han demostrado que la incapacidad para producir GM-CSF protege del desarrollo de enfermedades autoinmunes como EAE y miocarditis auto-inmunitaria^{82,83}. Además, la administración in vivo de un anticuerpo neutralizante anti-GM-CSF previene la inflamación asociada a la autoinmunidad^{84,85}, lo que ha llevado a proponer dicho tratamiento como una estrategia terapéutica en artritis y psoriasis.

Otra patología asociada a la alteración de la señalización de GM-CSF es la Proteínosis alveolar pulmonar (PAP), descubierta de manera fortuita en el ratón deficiente en GM-CSF⁸⁶. PAP es una enfermedad rara caracterizada por la acumulación alveolar de surfactante debido a su defectuosa eliminación por los macrófagos alveolares. El GM-CSF en los pulmones es necesario para la supervivencia, diferenciación, proliferación y funcionamiento de los macrófagos alveolares¹⁴. La deficiencia de GM-CSF, el descenso en sus concentraciones normales, mutaciones en el receptor CSF2-R o la producción de auto-anticuerpos anti-GM-CSF, desembocan en el desarrollo de PAP, por cuanto previenen la adquisición de la capacidad de catabolizar los lípidos del surfactante⁸⁷.

Metabolitos.

Existe un amplio abanico de moléculas que determinan y modulan la diferenciación de macrófagos en tejidos. Así, por ejemplo, el ácido retinoide, metabolito derivado de la vitamina A, es esencial para la diferenciación de macrófagos peritoneales mediante la inducción de GATA6⁸⁸. En el bazo, los macrófagos de la pulpa roja se exponen continuamente a eritrocitos senescentes y se especializan en fagocitar y reciclar el grupo heme, que señala vía SPI-C y favorece su diferenciación. Por su parte, los oxisteroles, ligandos moduladores de LXR α (codificado por *NR1H3*), juegan un papel clave en la diferenciación de macrófagos de la zona marginal esplénica⁸⁹. Finalmente, moléculas derivadas del metabolismo del triptófano (kynurenina entre otras) y el ácido araquidónico son activadores de la acción del factor transcripcional AhR, que juega un papel capital en la diferenciación de monocitos hacia macrófagos⁹⁰.

1.3 Macrófagos en inflamación.

Como se ha comentado anteriormente, los macrófagos presentan una alta plasticidad funcional, lo que les permite responder a las necesidades de su microentorno, buscando mantener o restaurar la homeostasis del

mismo. Los macrófagos expresan una plétora de moléculas y mecanismos sensores de su entorno, lo que les permite detectar la presencia de patógenos (mediante los receptores de PAMP) o reconocer daño en los tejidos (mediante los receptores de DAMP). El reconocimiento de estas señales dañinas induce el estrés tisular y promueve la respuesta inflamatoria⁴.

En las primeras fases de la respuesta inflamatoria se incrementa el número de células para potenciar la defensa inmune. Los monocitos del torrente sanguíneo son reclutados al tejido dañado y se diferencian en macrófagos inflamatorios. Los macrófagos de carácter inflamatorio son capaces de eliminar los patógenos mediante la producción de enzimas, péptidos antimicrobianos y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como llevando a cabo la fagocitosis de los mismos. Una de las características principales de los macrófagos pro-inflamatorios es la producción de citoquinas y quimioquinas (TNF, IL-1 β , IL-12, IL-23, CCL2...), a través de las cuales orquestan la respuesta inflamatoria y regulan el reclutamiento de otras poblaciones de leucocitos (NK, linfocitos T, neutrófilos)^{10,91}. Por ende, los macrófagos pro-inflamatorios promueven la activación de los leucocitos reclutados, siendo capaces de presentar antígenos a través de sus moléculas de membrana MHC (clase I y II)⁹². Posteriormente, y una vez eliminado el estímulo que ha desencadenado la inflamación, aumenta el porcentaje de macrófagos con actividad anti-inflamatoria, que pueden derivar de monocitos circulantes, de macrófagos tisulares y de la reconversión de los macrófagos pro-inflamatorios tras la captura de cuerpos apoptóticos. Las ideas actuales sugieren que son los macrófagos tisulares residentes los que mayoritariamente contribuyen a la resolución de la inflamación, mientras que las actividades pro-inflamatorias son fundamentalmente desempeñadas por macrófagos derivados de monocitos y reclutados al tejido dañado. Entre las moléculas que promueven la resolución de la inflamación, destaca especialmente la IL-10, así como el TGF β 1 y el PDGF^{10,93}. Además, los macrófagos anti-inflamatorios, merced a su capacidad de producir metaloproteinasas de matriz (MMP)⁹⁴, modifican la matriz extracelular y favorecen a la liberación de factores como HB-EGF, lo que favorece la recuperación de la estructura tisular y la cicatrización de heridas. Por otro lado, los macrófagos anti-inflamatorios se caracterizan también por promover respuestas inmunitarias en las que predominan los linfocitos Treg, por lo que también desempeñan una potente actividad inmunosupresora.

De forma global, la transición del estado inflamatorio al anti-inflamatorio asegura la recuperación de la homeostasis del tejido tras la eliminación del daño o patógeno. Y como se ha mencionado anteriormente, el desbalance entre ambas actividades (por exceso o defecto de una de ellas) desencadena patologías inflamatorias de manera tejido-específica⁴. Así, la exacerbación de la actividad o el número de macrófagos pro-inflamatorios está en el origen de patologías como la artritis reumatoide, la obesidad y la enfermedad de Alzheimer^{95,96}. En el caso contrario, y como consecuencia de un proceso anti-inflamatorio exacerbado, se desencadenan enfermedades fibróticas y la alteración morfológica y estructural del tejido.

El desequilibrio entre ambos tipos de macrófagos es especialmente relevante en el caso de los tumores. En primera instancia, el tumor es reconocido por los macrófagos pro-inflamatorios, los cuales se activan para promover una respuesta inmunitaria antitumoral y citotóxica. Sin embargo, el tumor es capaz de modificar las funciones efectoras de los macrófagos circulantes, promoviendo y potenciando su carácter anti-inflamatorio e inmunosupresor, e incluso induciendo en ellos actividades pro-angiogénicas. Este cambio en el estado inflamatorio de los macrófagos intratumorales cursa con una dramática alteración de su perfil transcripcional. Cabría decir que existe una simbiosis entre los macrófagos asociados al tumor (TAM) y las células del tumor. Como ejemplo, las células de carcinoma de mama promueven el reclutamiento y supervivencia de macrófagos mediante la secreción de M-CSF, factor que promueve la adquisición de actividades pro-tumorales, anti-inflamatorias e inmunosupresoras en macrófagos⁹⁷.

Como consecuencia de todos estos hechos referidos, el entendimiento de la biología y los mecanismos de regulación de los estados de activación del macrófago son de gran importancia para el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la reprogramación de macrófagos^{98,99}.

1.4 Activación del macrófago.

1.4.1 Estados de activación de macrófagos.

El estado de activación del macrófago (comúnmente denominado estado de polarización) viene determinado por el conjunto de señales presentes en el entorno circundante, cuyo reconocimiento por receptores de PAMP o DAMP activa vías de señalización, redes reguladoras transcripcionales y pos-transcripcionales que desembocan en la adquisición o pérdida de determinadas funciones efectoras. De esta manera, el macrófago es “programado” transcripcional y funcionalmente por las mencionadas señales extracelulares. Dada la amplitud de las señales extracelulares reconocidas por los macrófagos, estos pueden adquirir un muy amplio espectro de estados funcionales (estados de polarización), lo que ha llevado al planteamiento del modelo conocido como “colour wheel” de la polarización de macrófagos⁹¹, que ilustra las funciones efectoras más relevantes adquiridas por los macrófagos en respuesta a los factores de crecimiento, citoquinas y estímulos patogénicos más comunes (Fig. 3).

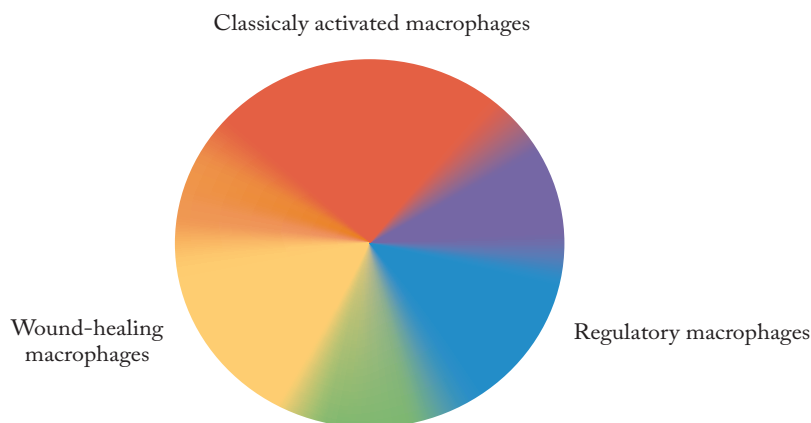


Figura 3. Modelo “Colour wheel” de los estados de activación del macrófago. Adaptada de ⁹¹.

Este modelo integra los intentos previos de describir los estados de polarización desde un punto de vista inmunológico, y que dio lugar a la clasificación M1/M2, muy extendida pero de utilidad limitada¹⁰⁰. La nomenclatura M1/M2, planteada por analogía a las respuestas inmunitarias Th1-Th2, hace referencia a los estados de polarización de macrófagos adquiridos en respuesta a interferón gamma (IFN γ), solo o en combinación con LPS, o en respuesta a IL-4/IL-13, y cuya diferencia más relevante reside en el opuesto metabolismo de la arginina de ambos tipos de macrófagos^{101,102}. El planteamiento del modelo conocido como “colour wheel”, y su posterior re-elaboración por Ruffell y Coussens¹⁰³, permiten explicar de una manera más realista la muy alta sensibilidad de los macrófagos a su entorno extracelular y la potencial adquisición de un sinnúmero de estados funcionales, tal y como se muestra en la Figura 4.

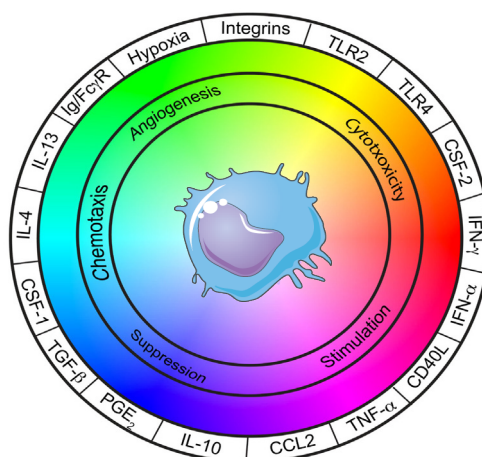


Figura 4. Polarización de macrófagos como sistema dinámico. La integración de múltiples señales que emanan del microambiente tumoral (círculo externo) dictan la adquisición de diferentes funciones efectoras de macrófagos (círculo interno). Integrinas

y receptores tipo toll (TLRs) participan en dicho proceso tras la unión de múltiples ligandos. Adaptada de ¹⁰³.

1.4.2 Influencia de GM-CSF y M-CSF en las actividades pro- y anti-inflamatorias de macrófagos.

Durante el presente trabajo de tesis doctoral hemos abordado el efecto que tienen diversos agentes sobre el estado transcripcional y funcional de macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de GM-CSF o M-CSF. Los estudios de nuestro grupo y otros han permitido demostrar que los macrófagos generados en presencia de GM-CSF (GM-MØ) exhiben una potente actividad pro-inflamatoria, inmunogénica y anti-tumoral, y son excelentes productores de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a estímulos patogénicos como el LPS. Por contra, los macrófagos generados en presencia de M-CSF (M-MØ) poseen una potente actividad anti-inflamatoria e inmunosupresora, y secretan muy elevados niveles de IL-10 en respuesta a LPS y otros ligandos de TLR¹⁰⁴⁻¹⁰⁷.

Nuestro grupo ha determinado las diferencias entre ambos tipos de macrófagos a nivel transcripcional ^(42,106-109), y ha definido un conjunto de genes que permiten distinguir a los macrófagos GM-MØ (caracterizados por la presencia del “Pro-inflammatory gene set”) de los M-MØ (con expresión exclusiva o preferencial del “Anti-inflammatory gene set”), y ha demostrado que la activina A es un inductor de la adquisición del “Pro-inflammatory gene set” e inhibe la expresión del “Anti-inflammatory gene set”¹⁰⁶, mientras que el factor de transcripción MAFB es preciso para la expresión del “Anti-inflammatory gene set”¹⁰⁷. Todos estos resultados se han empleado a lo largo del presente trabajo de tesis para la determinación de los efectos que la serotonina y el factor de transcripción AhR tienen sobre el estado de polarización de macrófagos (Fig. 5).

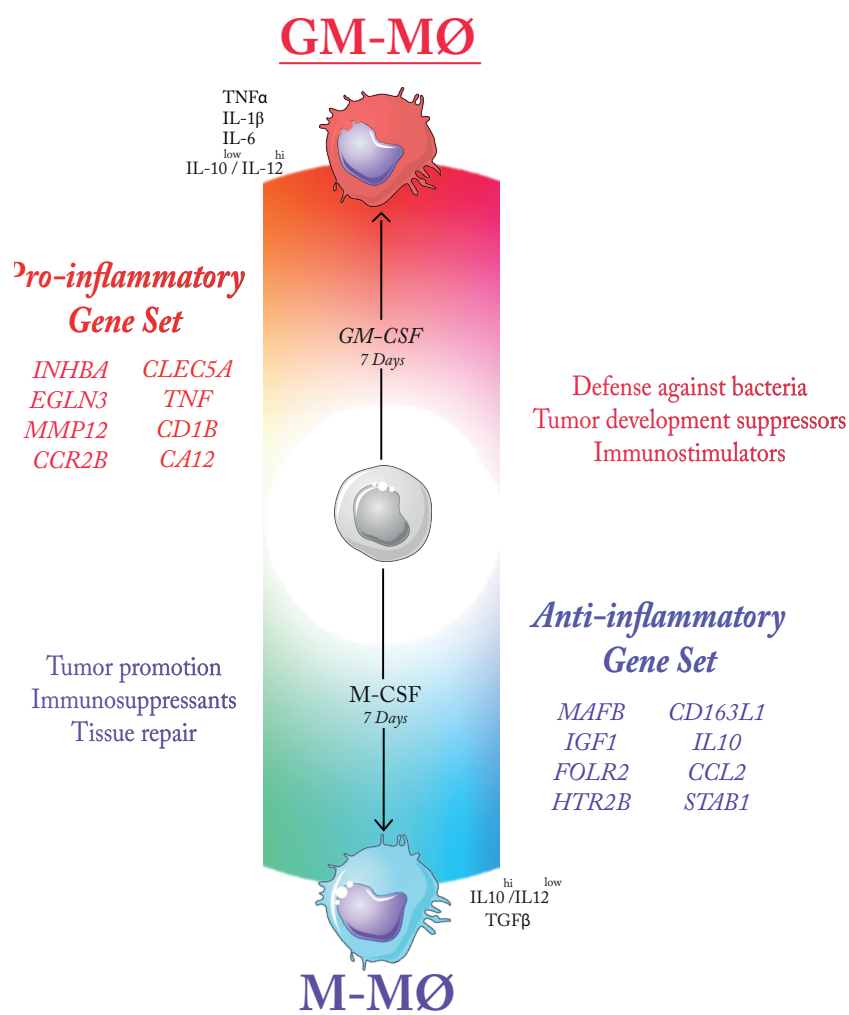


Figura 5. Modelo de diferenciación in vitro de monocitos. La diferenciación de monocitos en presencia de M-CSF durante 7 días genera M-MØ anti-inflamatorios, que expresan un perfil génico característico que incluye el “Anti-inflammatory gene set”. La diferenciación en presencia de GM-CSF deriva a GM-MØ cuyo perfil génico característico incluye el “Pro-inflammatory gene set”. Adaptada de ¹⁰⁶ y ¹⁰⁷.

2. Serotonina, más que un neurotransmisor.

2.1 Serotonina periférica.

La 5-hidroxitriptamina o serotonina (5-HT) es una amina biogénica aislada y caracterizada por primera vez en 1948 por Maurice Rapport e Irvine Page¹¹⁰. La serotonina toma su nombre de la palabra latina serum y la palabra griega tónica. La serotonina funciona como neurotransmisor (regula el sueño, el apetito, el estado de ánimo, la actividad reproductiva, la ansiedad y otras funciones cerebrales importantes) y como hormona periférica, juega un papel vital en órganos y tejidos fuera del CNS^{111,112}. La base molecular de esta dualidad radica en la existencia de dos isoformas de la Triptófano Hidroxilasa (TPH), la enzima limitante en la ruta de síntesis de la serotonina a partir de L-triptófano. La isoforma TPH1 se expresa en la glándula pineal y en tejidos periféricos, mientras que la isoforma TPH2 se expresa exclusivamente en el núcleo dorsal del rafe¹¹³. Casi el 95% de la serotonina está presente fuera del CNS y es producida mayoritariamente por las células enterocromafinas del intestino. De esta forma, y dado que la serotonina no atraviesa la barrera hemato-encefálica, se puede hablar de dos sistemas independientes de serotonina, el cerebral y el periférico.

La serotonina periférica producida por las células enterocromafinas es liberada al torrente sanguíneo y es reconocida e internalizada por las plaquetas mediante el transportador SERT. En respuesta a un estímulo, las plaquetas liberan la serotonina, que ejerce sus funciones periféricas como hormona. Las plaquetas son, por tanto, las principales reguladoras de la concentración plasmática de 5-HT, manteniendo rangos milimolares en sus gránulos, lo que permite que en el plasma no se exceda la concentración nanomolar, aunque en una situación de daño pueden alcanzarse concentraciones de magnitud milimolar en la zona cercana a la liberación. La 5-HT periférica está involucrada en numerosos procesos fisiológicos (desarrollo embrionario, vasoconstricción, angiogénesis, control de la temperatura, regeneración del hígado, desarrollo de la glándula mamaria, osteoclastogénesis, inflamación y fibrosis)^{111,112,114,115} y niveles alterados de la misma desencadenan, o se vinculan con, trastornos cardiovasculares, enfermedades respiratorias y osteoporosis.

La serotonina, por tanto, juega un papel clave en una amplia gama de procesos biológicos. De manera significativa, la serotonina también contribuye a la hematopoyesis y modula significativamente las funciones efectoras de granulocitos, linfocitos, monocitos, células dendríticas y macrófagos residentes en el tejido¹¹⁶⁻¹¹⁸. De hecho, es conocido su efecto en patologías de carácter inflamatorio como la hipertensión arterial pulmonar (PAH)^{119,120}, la dermatitis atópica, el asma alérgica, la esclerosis sistémica, trastornos inflamatorios del intestino, angiogénesis del cáncer, artritis inducida por colágeno y esclerosis lateral amiotrófica^{112,115,118-125}.

2.2 Serotonina en el sistema inmune

En el marco del sistema inmune, el papel de la serotonina es más que notorio. La 5-HT periférica funciona como un factor de crecimiento para las células progenitoras hematopoyéticas, contribuye a la proliferación y supervivencia de los progenitores eritroides¹²⁶ y megacariocitos¹²⁷, aumenta la proliferación y movilidad de las células CD34⁺ sensibles a GM-CSF, aumenta la cantidad de progenitores comprometidos tempranos y multilinaje (linajes eritroides, mieloides, megacariocitos) y promueve la formación de linajes mieloides y la liberación de monocitos/macrófagos. Estas acciones de la serotonina directamente relacionadas con la hematopoyesis han sido de gran utilidad a la hora de demostrar la existencia de “sistemas microserotonérgicos”, donde la producción local tisular de 5-HT reemplaza la función hormonal de 5-HT derivada del intestino¹²⁸.

La concentración fisiológica de 5-HT plasmática aumenta significativamente durante la inflamación en sangre periférica y alrededor de las áreas inflamadas^{129,130} debido a la liberación por plaquetas activadas y expuestas a estímulos pro-inflamatorios¹³¹. Estos niveles aumentados de 5-HT influyen en el desarrollo de las respuestas inmunitarias e inflamatorias al modificar las funciones efectoras de linfocitos, células NK y células monocíticas, macrófagos y dendríticas. De hecho, 5-HT promueve la supervivencia y la proliferación de linfocitos T y B activados por mitógeno¹³², mejora la proliferación, la producción de IFN γ y la función citolítica de NK in vitro¹³³ y mejora la migración hacia tejidos inflamados de mastocitos, eosinófilos y neutrófilos^{134,135}. 5-HT también influye en la morfología de las células dendríticas y controla su motilidad quimiotáctica hacia los

ganglios linfáticos al controlar la expresión de CCR7¹³⁶. Además de este papel directo en células dendríticas, la serotonina es capaz de ser transportada desde estas células a los linfocitos T para modular su activación, proliferación y diferenciación¹³⁷. Los niveles elevados de serotonina durante las respuestas inflamatorias contribuyen también a regular la producción de citoquinas durante la promoción y resolución de la inflamación. Así, la serotonina es capaz de aumentar la producción de IFN γ por células NK1³⁸, aunque se ha reportado que en sangre completa se da una supresión de la producción de IFN γ , TNF e IL-1^{39,140}. La serotonina también aumenta la producción de IL-1 β e IL-8 en monocitos estimulados por LPS, donde simultáneamente disminuye los niveles de TNF¹⁴¹. Las acciones moduladoras de 5-HT en células del sistema inmune dependen de su estado de maduración funcional, puesto que el perfil de receptores de serotonina de los leucocitos se modifica con el estado de activación. Así, las células dendríticas inmaduras expresan 5-HT_{1B}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{2B}, mientras que las células dendríticas maduras expresan 5-HT₄ y 5-HT₇¹⁴². En línea con esto, la 5-HT altera la expresión de IL-1 β , IL-8, IL-12 y TNF solo en células dendríticas maduras derivadas de monocitos, mientras que modifica la producción de IL-6, IL-10 y CCL22 en ambas poblaciones de células dendríticas¹⁴². En general, la alteración de la producción de citoquinas por células dendríticas causada por serotonina se traduce en una capacidad de polarización de células T alterada. Específicamente, 5-HT favorece la generación de respuestas inmunes de tipo Th2 tanto in vivo como in vitro¹⁴³. En línea con este efecto, 5-HT también reduce la expresión de CD1a y la expresión de moléculas coestimuladoras en las células dendríticas que expresan 5-HT₇¹⁴², lo que reduce su capacidad de presentación de antígeno y altera su capacidad de polarización de células T CD4¹⁴³. Estas y otras funciones de 5-HT en el sistema inmune vienen reflejadas en la Fig. 6.

Effects of serotonin on immune cells				
Biological process	Cell type	Receptor	Reference	
Phagocytosis and cytotoxicity	Macrophages / PMN		J Pathol Bacteriol 82:355-361, 1961.	
	Macrophages		J Immunol 138:4360-4365, 1987.	
	NK cells	5-HT _{1A}	Cell Immunol 127:199-214, 1990.	
	Leukocytes		Cancer Lett 62:83-86, 1992.	
	Peritoneal macrophages	5-HT _{1A}	Br J Pharmacol 139:457-463, 2003.	
Adhesion and migration	Mononuclear cells		Immunopharmacol Immunotoxicol 15:243-250, 1993.	
	Monocytes	5-HT _{1A}	Scand J Immunol 37:7-18, 1993.	
	Eosinophils		J Immunol 173:3599-3603, 2004.	
	Mast cells		J Immunol 177:6422-6432, 2006.	
	Dendritic cells		PLoS One 4:e6453, 2009.	
	Microglia		Brain, Behavior, and Immunity 26:419-428, 2012	
	Neutrophils		Blood 121:1008-1015, 2013.	
	Eosinophils		PLoS One 8:e54840, 2013.	
Oxidative burst	Dendritic cells	5-HT ₇	J Cell Sci 128:2866-2880, 2015.	
	Macrophages		Biochem Biophys Res Commun 131:1160-1167, 1985.	
Cytokine production TNF IFN γ IL-1 β IL-6 IL-10 TGF β 1 PGE2 IL-12 IL-17 CCL2	Phagocytes		Platelets 18:583-590, 2007	
	Monocytes		Life Sci 48:2557-2562, 1991.	
	NK cells		J Interferon Res 13:33-38, 1993.	
	Whole blood		Neuropsychopharmacology 23:89-98, 2000.	
	Vascular smooth muscle cells		Circulation 102:2522-2527, 2000.	
	Aortic valve interstitial cells.		Am J Pathol 161:2111-2121, 2002.	
	LPS-treated PBMC	5-HT _{2A}	Int Immunol 15:233-240, 2003.	
	Microglial MC-3 cells	5-HT ₇	Neuropharmacology 49:40-47, 2005.	
	Whole blood		Psychiatry Res 134:251-258, 2005.	
	Monocyte / Dendritic cells	5-HT ₁₋₇	Clin Exp Immunol 146:354-361, 2006.	
	Macrophages		Clin Exp Immunol 150:340-348, 2007.	
	Monocytes	5-HT ₁₋₇	J Invest Dermatol 127: 1947-1955, 2007.	
	Macrophage-like synovial cells	5-HT _{2A-3}	Rheumatol Int 28:1017-1022, 2008.	
	Dendritic cells		PLoS One 4:e6453, 2009.	
	Alveolar macrophages	5-HT _{2C}	Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 299:L272-280, 2010.	
	Proliferation Survival	Dendritic cells		Am J Pathol 178:662-671, 2011.
		Peritoneal macrophages	5-HT ₃	Brit J Pharmacol 172:1136-1147, 2015.
T lymphocytes		5-HT _{1A}	J Immunol 151:1175-1183, 1993.	
B lymphocytes		5-HT _{1A}	Cell Immunol 163:1-9, 1995.	
Lymphocytes		5-HT _{1A}	Brain Behav Immun 18:24-34, 2004.	
Megakaryocytes		5-HT _{2B}	Stem Cells 32:2973-2982, 2014.	
T cell priming T cell polarization	Erythroid Progenitors	5-HT _{2A}	Cell Rep. 26:3246-3256, 2019.	
	Macrophages		Immunology 84:148-152, 1995.	
	Monocyte / Dendritic cells	5-HT ₁₋₇	Clin Exp Immunol 146:354-361, 2006.	
	Monocytes	5-HT ₁₋₇	J Invest Dermatol 127: 1947-1955, 2007.	
	T lymphocytes	5-HT ₇	Blood 109:3139-3146, 2007.	
Radical scavenger	Dendritic cells		PLoS One 4:e6453, 2009.	
	Dendritic cells		Am J Pathol 178:662-671, 2011.	
Immunomodulation Inflammation Fibrosis		5-HT _{2A-B}	Am J Pathol 186:927-937, 2016.	
	Mononuclear phagocytes		Eur J Clin Invest 25:477-484, 1995.	
	Microglia		J Neurochem 69:2096-2101, 1997	
	Mononuclear cells		J Interferon Res 8:705-716, 1988.	
	Monocytes	5-HT ₃	Scand J Rheumatol Suppl 119:28-32, 2004	
Serotonin uptake GPIIb α shedding Experimental colitis Arthritis/Bone resorption	Aortic smooth muscle cells	5-HT _{2A}	J Pharmacol Exp Ther 327:316-323, 2008.	
	Muscularis macrophages	5-HT ₄	Gut 60:638-647, 2010.	
	Whole blood	5-HT _{2A}	PLoS One 8:e75426, 2013.	
	Macrophages	5-HT ₇	Sci Rep 7:14761, 2017.	
Serotonin uptake	Macrophages		Life Sci 42:1641-1650, 1988.	
	Dendritic cells		Blood 107:1010-1017, 2006.	
GPIIb α shedding	Platelets	5-HT _{2A}	J Thromb Haemost 7:1163-1171, 2009.	
Experimental colitis	Peritoneal macrophages		Gastroenterology 137:1649-1660, 2009.	
Arthritis/Bone resorption	ζ Splenocyte/Osteoclast?	5-HT _{2A-B}	Am J Pathol 186:927-937, 2016.	

Figura 6. Efectos de la serotonina en el sistema inmune. Adaptada de 5-HT_{2B} on Macrophages: what for? C.Nieto et al. 2019 .En revisión.

2.3 Receptores de serotonina.

Para ejercer sus funciones, la serotonina es reconocida por una familia de siete tipos de receptores de serotonina, conocidos como 5-HT_x (del 5-HT₁ al 5-HT₇) y codificados por 17 genes diferentes (HTR1-HTR7). Seis de las siete clases de receptores 5-HT pertenecen a la superfamilia de GPCR, y su la señalización intracelular depende de su correcto acoplamiento a los transductores heterotriméricos proteínas G (G α , G β y G γ). En humanos, hay 16 subunidades G α , 5 G β y 13 G γ que pueden combinarse para formar una amplia gama de proteínas G heterotriméricas. Cada subunidad G α puede señalizar independientemente, mientras que las subunidades G β y G γ son heterodímeros obligados que funcionan como una sola unidad (G $\beta\gamma$). Las 16 subunidades G α se clasifican en 4 familias principales de G α (G, Gi/o, Gq/11 y G12/13) que regulan efectores clave (por ejemplo, adenilil ciclasa, fosfolipasa C, etc.) y la generación de mensajeros secundarios (por ejemplo, cAMP, Ca²⁺, inositol 1, 4,5-trifosfato (Ins (1, 4,5) P3), etc.). Ahora está bien establecido que numerosos receptores distintos pueden acoplarse a la misma proteína G α y que el mismo receptor también puede acoplarse a más de una proteína G α . Las subunidades G $\beta\gamma$ tienen funciones reguladoras y de señalización, que incluyen, por ejemplo, servir como armazones para receptores quinasas y como moduladores de canales¹¹⁴.

En la actualidad se sabe que los receptores 5-HT₁ (1A, 1B, 1D, 1E y 1F) regulan negativamente la ruta de la Adenilato ciclasa (AC), al contrario que 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇, que la regulan positivamente. Asimismo, el grupo de receptores 5-HT₂ (2A, 2B y 2C) activa la cascada de la fosfolipasa C. El único receptor de estos siete que no se encuentra acoplado a ninguna proteína G es el receptor 5-HT₃, que es un canal iónico¹⁴⁸. La figura 7 ilustra las rutas de señalización iniciadas por los 7 receptores de serotonina descritos anteriormente.

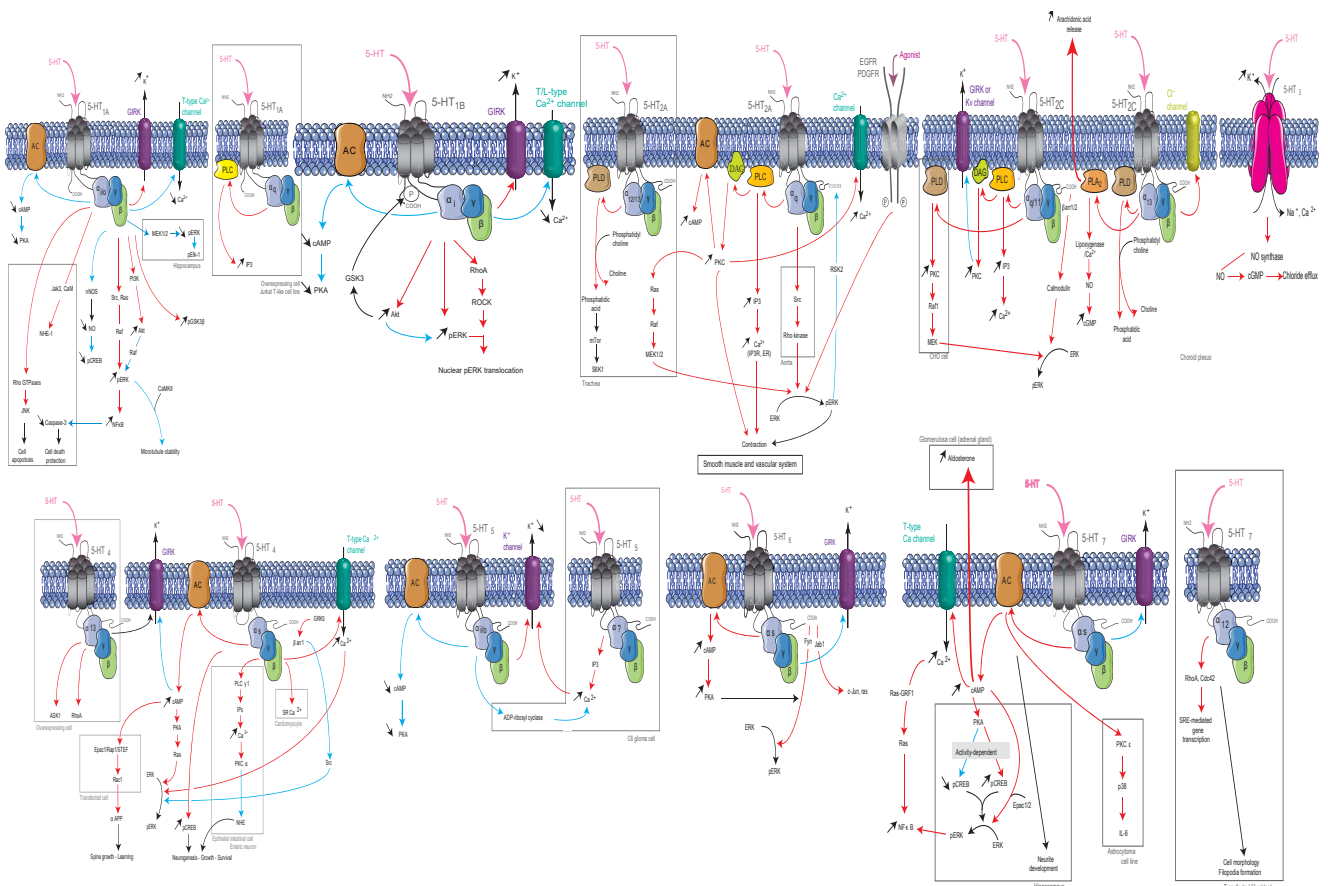


Figura 7. Receptores de serotonina y su señalización intracelular. Adaptada de ¹⁴⁸.

El número exacto de receptores de 5-HT varía de una especie a otra, y algunos de sus genes presentan un patrón de expresión especie-específico (5-HT_{3C}, 3D, 3E, 5-HT_{1E}). Además, el procesamiento del RNAm precursor de algunos de estos genes, aumentan el número de isoformas funcionales, con 10 variantes para 5-HT₄ y 24

para 5-HT_{2C}, por ejemplo. De manera reseñable, se sabe que, en ratón, el conjunto de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C} y 5-HT₇ regula la acción del sistema cardiovascular. En el caso del músculo liso se expresa principalmente el receptor 5-HT_{2A}, mientras que en el tracto gastrointestinal destaca la expresión de los receptores 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT₄, 5-HT₇.

2.3.1 Serotonina y macrófagos humanos.

En el caso de los macrófagos, la serotonina modifica una gran cantidad de sus funciones, ejerciendo primordialmente efectos anti-inflamatorios. Así, la serotonina suprime la expresión de MHC de clase II inducida por IFN γ ¹⁴⁹, aumenta la angiogénesis mediada por macrófagos asociados a tumores mediante la reducción de la expresión de MMP12 y de angiostatina, y regula la expresión de CCL2 en macrófagos alveolares que expresan 5-HT_{2C}¹⁵⁰. Así mismo, la serotonina favorece la expresión de PGE2^{151,152}, aumenta la producción de IL-10 (tras estimulación con LPS) y reduce la secreción de TNF en macrófagos alveolares humanos¹⁵⁰. Además, 5-HT también conduce a la activación preferencial de ERK y CREB¹⁰⁹, que están directamente relacionadas con la respuesta anti-inflamatoria¹⁵³, y es capaz de inhibir la activación de STAT1 inducida por LPS¹⁵⁴.

De los 7 receptores de serotonina identificados, los macrófagos derivados de monocitos humanos expresan mRNA para 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ y 5-HT₇^{109,114,141}. En macrófagos generados in vitro a partir de monocitos, el rango de expresión de receptores depende del factor inductor de dicha diferenciación. En el caso de GM-M \emptyset , éstos presentan niveles muy bajos (casi nulos) de todos los subtipos de receptores de serotonina. Por contra, los macrófagos generados en presencia de M-CSF expresan principalmente mRNA para los receptores 5-HT₇ y 5-HT_{2B}, y la expresión de ambos desaparece casi completamente tras su activación con LPS¹⁰⁹. Este característico balance de la expresión de los receptores de serotonina en los diferentes estados de activación de los M-M \emptyset pone ya de manifiesto el papel de dicha amina en la regulación de dicha activación.

En línea con lo anteriormente comentado, nuestro laboratorio ha descrito que la 5-HT inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12 y TNF α) en macrófagos humanos, principalmente a través de 5-HT₇¹⁵⁴, y sesga el transcriptoma de los macrófagos humanos hacia un perfil anti-inflamatorio a través de 5-HT_{2B} y 5-HT₇^{109,154}. Específicamente, la serotonina disminuye los mRNA correspondiente a genes del “Pro-inflammatory gene set” (*INHBA*, *CCR2*, *MMP12*, *ALDH1A2*, *CD1B* y *SERPINE1*) a la vez que se aumenta la de genes específicos del perfil anti-inflamatorio de M-M \emptyset (*SERPINB2*, *COL23A1*, *THBS1*, *STAB1*).

2.4. 5-HT_{2B}; Expresión y señalización intracelular.

5-HT_{2B}, codificado por el gen *HTR2B* en la posición cromosómica 2q36.3–2q37.1¹⁵⁵, se expresa durante la embriogénesis y medias acciones esenciales de 5-HT en el desarrollo^{155,156}. 5-HT_{2B} desempeña un papel clave en la diferenciación de las células de la cresta neural y en el desarrollo del corazón. De hecho, los ratones *Htr2b* *-/-* exhiben letalidad embrionaria y neonatal debido al aumento de la apoptosis acompañado por un descenso en el número de células en las trabéculas ventriculares, así como un descenso en la densidad ósea. Todos los ratones *Htr2b* *-/-* que sobreviven hasta la primera semana postnatal alcanzan la edad adulta y muestran síntomas similares a una miocardiopatía dilatada¹⁵⁷. En la madurez, 5-HT_{2B} se distribuye principalmente en tejidos periféricos (tejidos cardiovasculares, estómago, intestino, músculo liso pulmonar, células pulmonares y vasculares, cardiomiocitos) pero también se detecta en áreas restringidas del cerebro, más específicamente en la corteza, el hipocampo, la amígdala, y en el cerebelo. El uso de los ratones *Htr2b* *-/-* ha permitido caracterizar la importancia de este receptor en cerebro, concretamente en células de microglía, en las cuales la ausencia de 5-HT_{2B} se asocia a un perfil más pro-inflamatorio y niveles elevados de genes inflamatorios directamente relacionados con la quimiotaxis (*Ccr2*, *Ccr3*, *Ccr5*, *Cxcr5*)¹⁵⁸.

En cuanto a su señalización, las señales intracelulares disparadas por la activación de 5-HT_{2B} parecen ser célula-específicas¹⁴⁸ (Fig. 7). 5-HT_{2B} está acoplado a proteínas G α q que activan la PLC, produciendo un incremento de PI3 y de DAG tras la unión de 5-HT o sus agonistas¹⁵⁹. La señalización por DAG desencadena

un incremento de PKC y posterior internalización de Ca^{2+} . Además, la activación de PLC y el incremento de la función de PI3K/AKT resultan en la activación de NF κ B, que participa en la regulación de la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) en la vasculatura pulmonar¹⁴⁸. En el caso de astrocitos tratados con Fluoxetin, 5-HT_{2B} potencia la acción de PLA2 y desencadena la fosforilación de ERK1/2 a través de la transactivación de EGF¹⁶⁰.

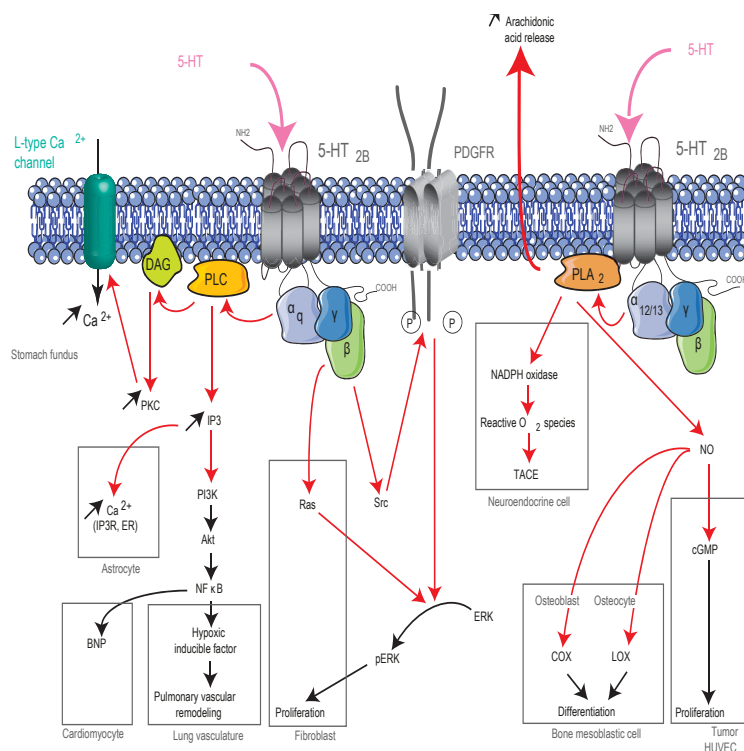


Figura 8. Señalización intracelular de 5-HT_{2B}. Adaptada de ¹⁴⁸.

Así mismo, 5-HT_{2B} también activa la tirosina quinasa citoplasmática oncogénica p60Src, que induce tanto ciclina D1 como ciclina E a través de vías dependientes o independientes de MAPK, respectivamente¹⁶¹. Estas ciclinas conducen a la inducción de Retinoblastoma (pRB) y el factor de transcripción E2F, que posteriormente activan la transcripción de los genes involucrados en la replicación del DNA. La señalización por el eje 5-HT_{2B}-p21Ras-p60Rsc, junto con la contribución de los receptores del factor de crecimiento PDGFR y ErbB-2, parece jugar un papel fundamental en la mitosis inducida por 5-HT_{2B}¹⁶². De hecho, existe una clara correlación entre la activación de 5-HT_{2B} y la proliferación celular en varios tipos celulares y tejidos. En órganos como el corazón y el hígado, la serotonina promueve proliferación celular a través de 5-HT_{2B}, y 5-HT_{2B} también favorece la supervivencia en los trasplantes de injertos de pequeño tamaño y mejora la capacidad de regeneración relacionada con la edad, así como la supervivencia celular en ausencia de suero mediante la activación de mTOR. Esta conexión deriva de la capacidad de 5-HT_{2B} de promover la expresión de factores de crecimiento como TGF- α y β ^{163,164,164}, IGF-1 y HGF¹⁶⁵. Dada la capacidad de los macrófagos anti-inflamatorios humanos de producir varios de estos factores, cabe la posibilidad de que esta conexión 5-HT_{2B}-factores de crecimiento sea operativa en macrófagos asociados a tumores, que expresan 5-HT_{2B}, y en los que la activación del receptor podría desencadenar la liberación de factores que favorezcan el desarrollo del tumor^{166,167}.

2.4.1 BW723C86.

Con el objetivo de ahondar en la importancia de 5-HT_{2B} en macrófagos humanos, decidimos utilizar el agonista sintético de este receptor, conocido como BW723C86. BW723C86, nombre comercial de la molécula 5-meill-(2-tienilmetoxi)-1H-indol-3-etanamina hidrocloreídrico (Fig. 8), fue descrito en 1996 por Smith Baxter y colaboradores¹⁶⁸. Esta molécula presenta una potente actividad agonista sobre el receptor 5-HT_{2B}, 10 veces mayor que sobre el receptor de serotonina 5-HT_{2c}, y 100 veces mayor que sobre el receptor 5-HT_{2A}¹⁶⁹. BW723C86 presenta efectos ansiolíticos en estudios con animales^{170,171} y su uso ha permitido establecer el

papel de 5-HT_{2B} en el desarrollo de las vías respiratorias y otros procesos^{168,172,173}. Estudios recientes llevados a cabo en melanocitos indican que BW723C86 reduce la expresión de MITF, lo que provoca un descenso en la expresión y acción de las enzimas sintetizadoras de melanina, TRP-1 y TRP-2, traducándose esto en una alteración de la pigmentación de la piel¹⁷⁴.

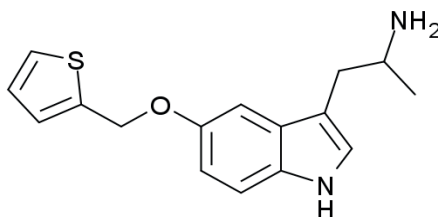


Figura 9. Estructura química del BW723C86. Adaptado de ¹⁶⁸.

2.4.2 5-HT_{2B} en patología.

Entre las patologías en las que 5-HT_{2B} tiene un papel significativo (Fig. 10) merecen ser destacadas:

1) Hipertensión arterial pulmonar (PAH) y enfermedad cardíaca valvular (VHD):

El primer nexo entre estas patologías y 5-HT_{2B} deriva de la observación de pacientes tratados con fenfluramina con el objetivo de promover la pérdida de apetito, y en los que se detectaron Hipertensión arterial pulmonar (PAH) y enfermedad cardíaca valvular (VHD) tras períodos de 18-24 meses. Desde el punto de vista molecular, ambas alteraciones se relacionaron con el hecho de que la fenfluramina es un potente agonista específico de 5-HT_{2B}¹⁷⁵, cuya sobre-activación en células intersticiales de la válvula cardíaca conduce a la formación de focos proliferativos y cambios en el tejido que causan el desarrollo de VHD¹⁷⁶.

La hipertensión arterial pulmonar (PAH) es un trastorno progresivo y fatal en humanos y resulta de un aumento en la presión arterial pulmonar asociada con una proliferación vascular anormal¹⁷⁷. Esta patología cursa con disfunción endotelial pulmonar y una proliferación aberrante de células endoteliales, células del músculo liso y fibroblastos pulmonares. Dicha proliferación es causada por el aumento de la presión arterial pulmonar debido a la constricción, desembocando en una hipertrofia y sobrecarga de presión del ventrículo derecho. El uso del modelo de ratón hipóxico crónico reveló que la PAH es consecuencia de la hipoxia, y que la remodelación pulmonar está asociada con un aumento de serotonina y 5-HT_{2B}, lo que altera la proliferación vascular, la actividad de la elastasa y los niveles de TGFβ^{178,179}. Posteriormente, se ha demostrado también la importancia de 5-HT_{2B} en progenitores de la médula ósea para el desarrollo de la PAH inducida por hipoxia o por monocrotalina¹¹⁹. De hecho, el bloqueo de 5-HT_{2B} con antagonistas específicos (SB204741, Terguride, PRX08066, C-122, RS-12744) disminuye la presión pulmonar y el engrosamiento de la pared arterial en modelos de PAH inducidos por hipoxia o monocrotalina¹⁸⁰⁻¹⁸². En este sentido, es importante reseñar que en los modelos de PAH inducida por monocrotalina o Sugen 5416 (un potente inhibidor de VEGFR1 y VEGFR2¹⁸³) se pueden prevenir con RP5063¹⁸⁴, un fármaco antipsicótico con alta afinidad por 5-HT_{2A}, y afinidad moderada por 5-HT_{2B}, lo que refuerza la conexión entre la activación de 5-HT_{2B} y el desarrollo de PAH¹⁸⁵.

2) Maduración cerebral:

En cuanto a la maduración cerebral se refiere, modelos de ratón han verificado el papel de 5-HT_{2B} en la motilidad de las células de microglía. Este hecho guarda relación con el efecto que la ausencia de 5-HT_{2B} tiene en el área de proyección ipsilateral de los axones de la retina en el tálamo¹⁵⁸.

3) Esclerosis lateral amiotrófica (ELA):

Modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) han evidenciado un incremento en la expresión de 5-HT_{2B} en macrófagos. 5-HT_{2B} tiene un papel importante en esta patología, y su eliminación conduce a una mayor degeneración de los fagocitos mononucleares, una mayor progresión de la enfermedad y una menor esperanza de vida¹²⁴. Posteriores estudios en pacientes de esta enfermedad han mostrado una asociación entre

la presencia de polimorfismos específicos en el gen *HTR2B* (alelo C, rs10199752, que correlaciona con aumento del RNAm de 5-HT_{2B} en la médula espinal), el descenso en la degeneración de los fagocitos mononucleares y un incremento en su supervivencia¹²⁴.

4) Depresión:

El trastorno depresivo mayor (MDD) suele ir acompañado de un aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (IL-2, TNF) y niveles reducidos de citoquinas anti-inflamatorias IL-4 y TGF- α 1 (aunque no está claramente determinado si estas alteraciones son causantes de la enfermedad o son secundarias)¹⁸⁵. En línea con estas observaciones, existen estudios que afirman que algunos tipos de MDD derivan de modificaciones en la correcta función de la microglía¹⁸⁶, lo que plantea un papel para los macrófagos en el desarrollo de esta patología^{187,187}. Estos hallazgos están relacionados con los cambios de comportamiento en pacientes que sufren respuestas infecciosas o inflamatorias, comúnmente denominadas “Sickness behavior”, que parecen relacionados con un aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias¹⁸⁹. Los síntomas del “Sickness behavior” son similares a los observados en pacientes con depresión, en la neuroinflamación inducida por LPS¹⁸⁹, tras vacunación contra virus¹⁹⁰ o en enfermedades que cursan con un incremento de ligandos de TLR (como la obesidad)¹⁹¹. Todo ello indicaría que la activación de los TLR en macrófagos provoca síntomas similares a la depresión por promover una inflamación de bajo grado y sesgarse su polarización hacia el perfil pro-inflamatorio.

La relación entre polarización pro-inflamatoria exacerbada y la aparición de síndromes similares a la depresión podría derivar del incremento de la síntesis y acción de la enzima IDO1 (indoleamina 2,3 dioxigenasa) como consecuencia de la activación de TLR y la subsiguiente producción de IFN de tipo 1. IDO1 es esencial para la síntesis de kynurenina (derivada del triptófano y ligando del factor de transcripción AhR), que poseen carácter pro-depresivo y cuya síntesis se acompaña de un descenso de niveles de triptófano y un desequilibrio en la síntesis de serotonina, todo lo cual favorece la aparición de los síntomas de MDD¹⁹². De hecho, IDO1 se expresa preferentemente en macrófagos del perfil pro-inflamatorio. Por otra parte, las citoquinas pro-inflamatorias en cerebro se regulan a la baja por factores que promueven o están asociados con la adquisición de una polarización antiinflamatoria (IL-10, IL-1, IGF1)¹⁹², y la administración de IGF1 es un tratamiento para la depresión¹⁹³. En esta misma línea, el uso de SSRI (inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina) para el tratamiento de la depresión corrige el desequilibrio de citoquinas durante respuestas inflamatorias¹⁹⁴. Teniendo en cuenta que los SSRI requieren de la activación de 5-HT_{2B} para llevar a cabo sus funciones anti-depresivas y anti-inflamatorias¹⁹⁵ y que la kynurenina son activadores de AhR, los resultados generados durante el presente trabajo de tesis doctoral, en el que demostramos una conexión directa entre 5-HT_{2B} y AhR, pueden contribuir también a aclarar el papel de los macrófagos (microglía) en MDD.

Effects of 5-HT _{2B} on immune cells and other cell lineages				
	5-HT _{2B} -mediated serotonin effects	Cell type	Receptor	Reference
Heart & Vessel wall	Valve disease (Ergot)			Ann Intern Med 117:50-52, 1992.
	Valvular abnormalities (carcinoid syndrome)			Circulation 92:790-795, 1995.
	Valvular heart disease (anorexic agents)			N Engl J Med 337:581-588, 1997.
	Morphogenetic functions	Myocardial cells	5-HT _{2B}	Development 124:1745-1755, 1997.
	Valvular Heart Disease (SSRI)		5-HT _{2B}	Circulation 102:2836-2841, 2000.
	Heart development		5-HT _{2B}	Proc Natl Acad Sci U S A 97:9508-9513, 2000.
	Cardiac hypertrophy		5-HT _{2B}	Circulation 107:3223-3229, 2003.
	Right ventricular failure	Cardiac fibroblasts	5-HT _{2B}	Biomed Res Int. 2015:438403, 2015.
Proliferation	Mitral valvulopathy	Endothelial progenitors	5-HT _{2B}	Br J Pharmacol 174:4123-4139, 2017.
	Vascular restenosis	Smooth Muscle cells	5-HT _{2B}	J Am Heart Assoc. 7:e006810, 2018.
	Cell-cycle progression	Fibroblasts	5-HT _{2B}	Proc Natl Acad Sci U S A 97:2591-2596, 2000.
	Proliferation	Endothelial cells	5-HT _{2B}	Neoplasia 11:408-417, 2009.
	Proliferation	Interstitial cells of Cajal	5-HT _{2B}	Neurogastroenterol Motil 22:462-469, 2010.
	Proliferation	Fibroblasts / Neuroend. tumors	5-HT _{2B}	Cancer 116:2902-2912, 2010.
	Proliferation	Pancreatic beta cells	5-HT _{2B}	Nat Med 16:804-808, 2010.
	Proliferation	Hepatocytes	5-HT _{2B}	Hepatology 53:253-262, 2011.
PAH	Proliferation	Hepatic stellate cells	5-HT _{2B}	Nat Med 17:1668-1673, 2011.
	Proliferation	Megakaryocytes	5-HT _{2B}	Stem Cells 32:2973-2982, 2014.
	Proliferation	Hepatocytes	5-HT _{2B}	Sci Rep. 5:8098, 2015.
	Proliferation	Hepatocytes	5-HT _{2B}	Biol. Pharm. Bull. 39: 121-129, 2016.
	Proliferation / TGF α production	Hepatocytes	5-HT _{2B}	Biol. Pharm. Bull. 39:570-577, 2016.
	Proliferation	Lung fibroblasts	5-HT _{2B}	Sci Rep. 8:1927, 2018.
	Pulmonary Arterial Hypertension (anorexic agents)			N Engl J Med 335:609-616, 1996.
	Pulmonary Arterial Hypertension		5-HT _{2B}	Nat Med 8:1129-1135, 2002.
Fibrosis	Pulmonary Arterial Hypertension	BM progenitors (?myeloid?)	5-HT _{2B}	Blood 119:1772-1780, 2012.
	Tissue fibrosis	Fibroblasts	5-HT _{2B}	J Exp Med 208:961-972, 2011.
Non-peripheral effects	Myofibroblast differentiation	Lung fibroblasts	5-HT _{2B}	Physiol Rep 4:e12873, 2016.
	Neonatal respiratory activity (BW723C86)	Medullary breathing center	5-HT _{2B}	J Neurobiol 66:949-961, 2006.
	Severe impulsivity		5-HT _{2B}	Nature 468:1061-1066, 2010.
	Behavioral and neurogenic effects (SSRI)		5-HT _{2B}	Molecular Psychiatry 17:154-163, 2012.
	Antinociceptive effect (BW723C86)	Sensory neurons / Macrophage	5-HT _{2B}	Pain 153:1320-1331, 2012.
	Antipsychotic-Sensitive Schizophrenic-Like Phenotype		5-HT _{2B}	Neuropsychopharmacology 40:2764-2773, 2015.
	Resistance to SSRI (fluoxetine)		5-HT _{2B}	Eur Neurobiol 26:265-279, 2016.
	Cocaine Responses		5-HT _{2B}	J Neurosci 37:10372-10388, 2017.
	Regulation of raphe serotonin neurons	Serotonin neurons	5-HT _{2B}	Neuropsychopharmacology 43:1623-1632, 2018.
	Aggression-related cannabis response		5-HT _{2B}	Mol Psychiatry 23:2277-2286, 2018.
Asthma	Phrenic motor facilitation		5-HT _{2B}	J Neurophysiol 119: 2176-2185, 2018.
	Regulation of raphe serotonin neurons	Serotonin neurons	5-HT _{2B-1A}	Neuropsychopharmacology 44:218-219, 2019.
	Cocaine-crack		5-HT _{2B}	World J Biol Psychiatry 4:1-6, 2019.
	Eosinophilia in allergic asthma mouse model		5-HT ₁₋₂	Br J Pharmacol 124:857-864, 1998.
	Airway remodelling in allergic asthma mouse model		5-HT ₂	Clin Exp Allergy 37:723-734, 2007.
	Prevention of allergic asthma mouse model		5-HT ₂	Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 308:L191-198, 2015.
	Control of IL6, TNF, IL1 α cytokine production	Ventricular fibroblasts	5-HT _{2B}	Circulation 110:969-974, 2004.
	Cytokine release	Dendritic cells	5-HT ₄₋₇	J Immunol 172:6011-6019, 2004.
Cytokine production	Cytokine and chemokine production	LPS-primed monocytes	5-HT ₃₋₄₋₇	Int Immunol 17:599-606, 2005.
	TGF β 1 production	Hepatic stellate cells	5-HT _{2B}	Nat Med 17:1668-1673, 2011.
	Inhibition of TGF β 1 production	Kupffer cells	5-HT _{2B}	Nat Med 17:1668-1673, 2011.
	Macrophage polarization	Macrophage	5-HT _{2B-7}	J Immunol 190:2301-2310, 2013.
	Cytokine release & T cell polarization	Dendritic cells	5-HT _{2B}	Sci Rep 8:1765, 2018.
	Motility and phagocytic activity	Microglia	5-HT _{2B} /others	Brain Behav Immun 26:419-428, 2012.
	Suppression of Ia expression	Macrophages	5-HT _{2B}	J Immunol 137:276-282, 1986.
	Angiogenesis / MMP12	Macrophage	n.d.	Cancer Res 68:5152-5158, 2008.
Other effects	Microglia development and synaptic refinement	Microglia	5-HT _{2B}	ACS Chem Neurosci 6:1219-1230, 2015.
	Amyotrophic lateral sclerosis progression	Microglia	5-HT _{2B}	Acta Neuropathol 131:465-480, 2016.
	Insulin secretion / PGC1 α - PPAR γ mRNA	Pancreatic b cells	5-HT _{2B}	PLoS One 12(1): e0170213, 2017.
	Ras activation	Fibroblasts, Carcinoid tumors	5-HT _{2B}	J Biol Chem 271:3141-3147, 1996.
	ERK1/2 activation, eNOS production	Endothelial cells	5-HT _{2B}	Neoplasia 11:408-417, 2009.
	Inhibition of oxidative burst	Leukocytes	5-HT ₂	Life Sci 86:518-523, 2010.
	Alkaline phosphatase activity	Osteoblasts	5-HT _{2B}	J Biol Chem 285:26066-26073, 2010.
	ERK, JunD	Hepatic stellate cells	5-HT _{2B}	Nat Med 17:1668-1673, 2011.
Signaling	Prostacyclin and PPAR- β / δ	Osteoblasts	5-HT _{2B}	PLoS One 8:e75783, 2013.
	ERK1/2 activation	Megakaryocytes	5-HT _{2B}	Stem Cells 32:2973-2982, 2014.
	pJNK, p21, STAT3 activation	Hepatocytes	5-HT _{2B}	Sci Rep. 5:8098, 2015.
	PLC / PI3K / ERK2 / mTOR	Hepatocytes	5-HT _{2B}	Biol. Pharm. Bull. 39: 121-129, 2016.
	b-Arrestin2 / mTOR / p70S6K	Smooth Muscle cells	5-HT _{2B}	J Am Heart Assoc. 7:e006810, 2018.
	p21, pAkt	Lung fibroblasts	5-HT _{2B}	Sci Rep. 8:1927, 2018.
	EGF / TGF α / p70S6K	Hepatocytes	5-HT _{2B}	Biol. Pharm. Bull. 42: 631-637, 2019.

Figura 10. Efectos de 5-HT_{2B} en células inmunes y otros linajes. Adaptada de 5-HT_{2B} on Macrophages: what for? C.Nieto et al. 2019. En revisión.

3. Receptor de Aryl Hidrocarburos (AhR).

3.1 Estructura y función.

El Receptor de Aril-hidrocarburos (AhR) es un factor de transcripción activado por ligando perteneciente a la superfamilia de factores bHLH PAS, que toma su nombre de los primeros componentes de esta familia descritos: PER (proteína periódica circadiana) –ARNT (Transportador nuclear de AhR) –SIM (proteína single-minded). Dentro de esta familia también se encuentran factores de transcripción implicados en el control del ritmo circadiano (BMAL1 y BMAL2) o la tensión de oxígeno y el potencial redox (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α). En cuanto a su estructura, AhR presenta tres dominios funcionales: Un dominio altamente conservado bHLH en el extremo amino terminal e implicado en la interacción con el DNA, un segundo dominio constituido por dos dominios PAS (PAS A y PAS B) de aproximadamente 110 aminoácidos e implicado en la dimerización y señalización, y un tercer dominio (Q) poco conservado en el extremo carboxilo y que es esencial para la transactivación^{196–198}.

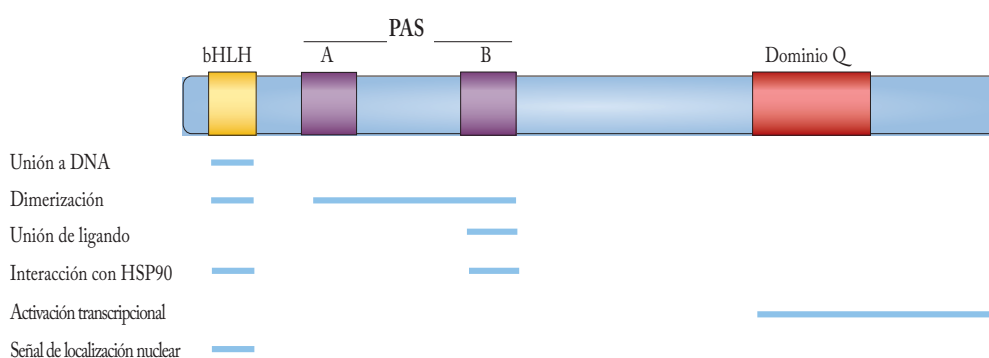


Figura 11. Dominios funcionales de AhR. AhR presenta en la región amino terminal un motivo hélices-bucle-hélice básica (bHLH) involucrado en la unión a DNA, la localización nuclear y las interacciones proteína-proteína, dos dominios PAS necesarios para la interacción entre proteínas y la unión de ligandos y un dominio rico en prolinas (Dominio Q) en la zona implicada en la activación transcripcional. Adaptada de ²⁰⁷.

Inicialmente AhR fue considerado como exclusivamente implicado en la coordinación de la respuesta frente a contaminantes exógenos, ya que regula la expresión de una numerosa batería de genes involucrados en procesos de detoxificación entre los que se incluyen los genes de la familia del citocromo P450, responsables del metabolismo de xenobióticos de fase I (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* y *CYP2S1*), así como enzimas de fase II UDP-glucuronosil transferasa (*UGT1A6*), quinona oxidoreductasa-1-NADPH-dependiente (*NQO1*), aldehído deshidrogenasas (*ALD3H1*) y varias glutatión-S-transferasas. Sin embargo, en la actualidad está bien establecido que AhR juega un rol crucial en procesos tales como la proliferación y diferenciación celular, en la homeostasis hepática y del sistema inmunitario, así como en el desarrollo de tumores ^{199,200}.

3.2 Mecanismos de funcionamiento.

AhR exhibe diferentes mecanismos de acción, que pueden globalmente dividirse en una vía de actuación canónica y otras no canónicas o alternativas.

3.2.1 Vía canónica.

En condiciones de ausencia de ligando, AhR permanece en el citoplasma, formando parte de un complejo molecular compuesto por un dímero de chaperonas HSP90, la proteína AIP de interacción directa con AhR (también conocida como XAP2), la co-chaperona p23 y la proteína quinasa SRC^{201–203}. Una de las moléculas HSP90 se une a la región PAS de AhR, mientras que la segunda molécula HSP90 interactúa en dos sitios de AhR, la región del motivo bHLH y la región PAS. AIP se encarga de estabilizar el complejo de AhR con las chaperonas mediante su interacción directa con HSP90 y AhR. Además, AIP es un potenciador de la activación de AhR, y favorece el plegamiento y la estabilización de la proteína AhR, favoreciendo su localización

citoplásmica al inhibir la interacción de AhR con la importina- β , que media el transporte de proteínas al núcleo. La co-chaperona p23 protege a AhR de la degradación por ubiquitinación y, de manera similar a la AIP, asegura la localización citoplásmica de AhR. Finalmente, SRC participa en los pasos iniciales de la activación de AhR tras la unión del ligando y también participa en mecanismos no genómicos de señalización de AhR. Este complejo multiproteico, por tanto, favorece la estabilización de AhR en el citoplasma y lo predispone al reconocimiento de ligandos²⁰¹⁻²⁰⁴. Una vez que un agonista se une a AhR, AIP se disocia del complejo, provocando la exposición de la señal de localización nuclear amino-terminal de AhR y una señal de exportación nuclear adyacente. El complejo AhR-ligando se transporta posteriormente al núcleo de manera dependiente de importina- β . En el núcleo, AhR se une a ARNT (HIF-1 β), y el complejo AhR-ARNT interacciona con elementos XRE (sitio de respuesta a xenobióticos) cuyo motivo consenso es 5'-TNGCGTG-3'²⁰⁵⁻²⁰⁷. Una vez completada su actividad transcripcional el complejo se desmonta, tras esto, AhR es transportado al citoplasma para su degradación por el proteosoma.

Es importante mencionar también que los componentes del complejo citoplásmico de AhR participan en la señalización inducida por agonistas de AhR, ya que la translocación de AhR al núcleo a veces resulta en la activación de SRC, que fosforila una amplia variedad de proteínas diana entre las que destacan IDO1 y miembros de las vías del ácido araquidónico²⁰⁸, lo que puede resultar en la generación de ligandos endógenos de AhR y promover su activación sostenida.

Como regulador negativo de este proceso de activación, el represor de AhR conocido como AhRR (cuya expresión es controlada por el propio AhR), compite con la interacción AhR-ligando y ARNT, lo que limita la disponibilidad de ARNT para la unión de AhR²⁰⁹. Es reseñable que el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) también compite con AhR por su interacción con ARNT, lo que implica una posible relación negativa entre la respuesta a hipoxia y la respuesta a ligandos de AhR²¹⁰.

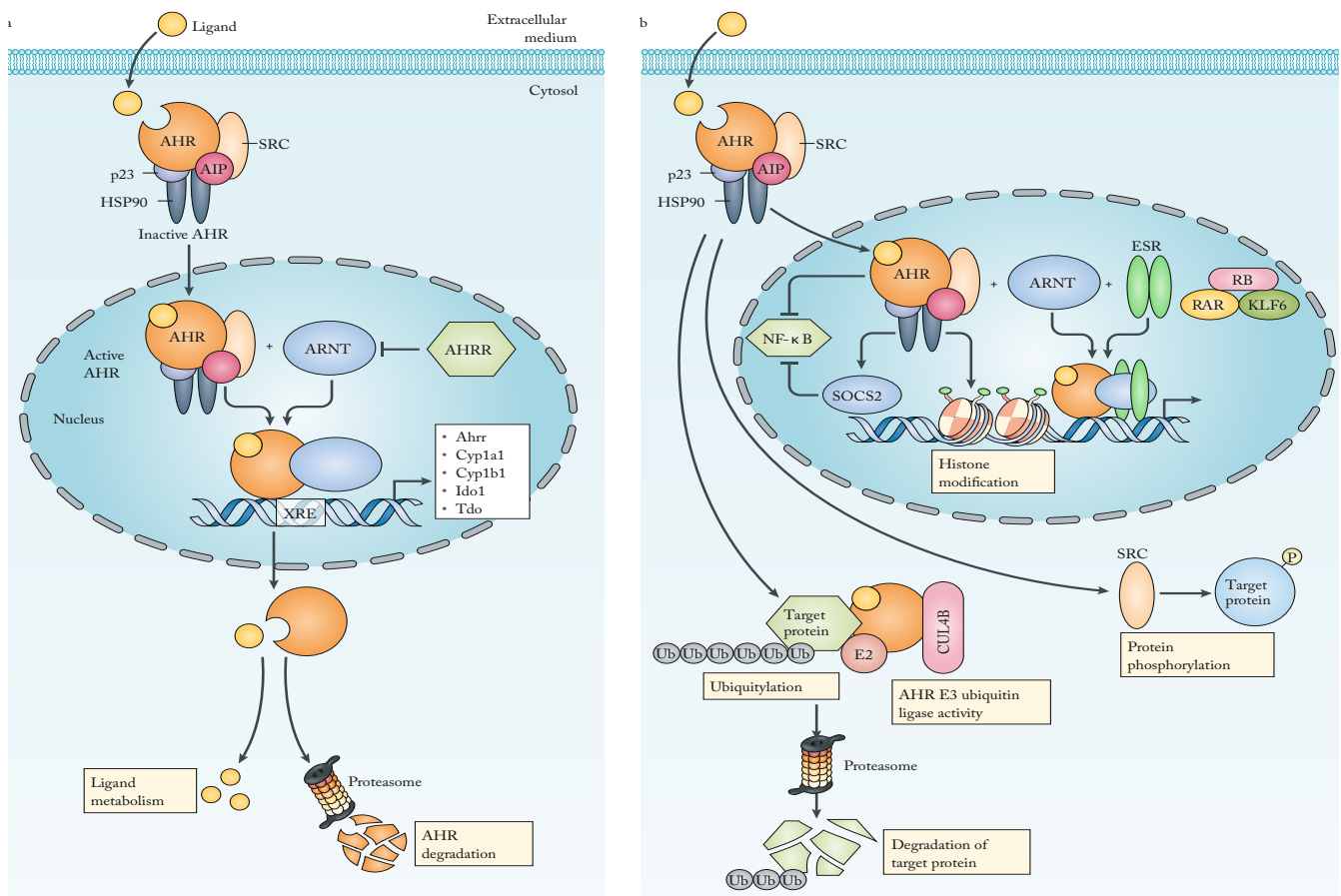


Figura 12. Señalización intracelular de AhR. a. El receptor inactivo AhR está unido a HSP90, AIP, p23 y SRC, y este complejo citoplásmico mantiene inactivo a AhR y previene su degradación. Tras la unión del agonista, AhR y algunos componentes del complejo se traslocan al núcleo, donde AhR se une a elementos XRE. b. AhR también puede interactuar con otros factores de transcripción adicionales de manera directa e indirecta, y funcionar como ubiquitina ligasa E3. AhRR, represor de AhR; ARNT;

translocador nuclear AhR; CUL4B, complejo de ubiquitina ligasa de cullina 4B; ESR, receptor de estrógenos; KLF6, factor 6 similar a Krüppel; RAR, receptor de ácido retinoico; RB, proteína de retinoblastoma; SOCS2, supresor de la señalización de citoquinas 2; Ub, ubiquitinación; XRE, elemento de respuesta a xenobióticos. Adaptada de ³⁰⁰.

3.2.2 Vías no canónicas.

Existen, además, un conjunto de mecanismos de acción alternativos de AhR entre los que destacan:

Mecanismos de regulación independiente de XRE.

Mediante la interacción con otros factores de transcripción, AhR es capaz de modular la expresión de genes que carecen de la señal de reconocimiento XRE. De hecho, el complejo AhR-ARNT-ligando interactúa con el receptor de estrógeno (ESR), lo que resulta en el reclutamiento del complejo AhR-ESR a elementos de DNA sensibles al estrógeno en ausencia de ligando²¹¹. De igual manera, este mecanismo se ha observado con el receptor de ácido retinoico (RAR) y la proteína del retinoblastoma (RB)²¹². Por lo tanto, además de los elementos XRE, AhR también interacciona con otros elementos reguladores reconocidos por otros factores, controlando por tanto la expresión de genes que no contienen XRE en sus regiones reguladoras²¹³.

Actividad Ubiquitín ligasa E3.

A través de su actividad como ubiquitín ligasa E3, AhR induce la ubiquitinación y la degradación dirigida por el proteasoma de proteínas diana, siendo capaz de regular la vida media de otros factores de transcripción. Concretamente, el complejo AhR-ligando se asocia con la Cullin 4B ubiquitina ligasa (CUL4B) para formar el complejo CUL4B-AhR que se dirige al ESR para su degradación proteasomal, y mecanismos similares controlan la degradación de factores de transcripción como p53, MYC, FOS, OCT4 y HIF-1 α ^{213,214}. De manera destacable, esta función ubiquitín ligasa E3 compite con la actividad como factor de transcripción de AhR, y este equilibrio depende de la disponibilidad y función de ARNT. Así, si los niveles de ARNT se reducen o se inhibe la acción de AhR, la actividad ubiquitín ligasa E3 de AhR aumenta²¹⁵.

Control transcripcional directo.

AhR controla la señalización por NF κ B, ya que es capaz de suprimir SOCS2 indirectamente, y también se ha reportado su unión y control directo con RELA, RELB y otros miembros del complejo de señalización NF κ B²¹⁶⁻²¹⁹. De forma adicional, AhR es un regulador de la acción de las proteínas STAT, que desempeñan un papel central en la regulación de las respuestas inmunitarias²²⁰.

Regulación epigenética.

Los mecanismos epigenéticos relacionados con AhR incluyen; 1) la regulación de la expresión génica de mediadores encargados de la modificación de histonas, derivada fundamentalmente de su capacidad de regular MEF2B y BCL6²²¹ y de su relación con deacetilasas de histonas como SIRT1²²², con el factor de elongación de la transcripción positivo (P-TEFb), el complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF y el activador de la transcripción BRG1 (también conocido como SMARCA4)²²³; y 2) su capacidad de controlar la expresión de micro-RNA (miRNA), en los modelos de enfermedades inflamatorias en ratón^{224,225}.

3.3 Papel en el sistema inmune.

AhR tiene efectos significativos en el control de la inmunidad adaptativa, por cuanto modula la diferenciación de las células T y ejerce efectos directos sobre las células presentadoras de antígenos. Por lo que se refiere a los linfocitos T, la activación de AhR por sus ligandos TCDD, ITE o kynuremina controla la polarización de linfocitos Th, aumentando el número de células T reguladoras FOXP3²²⁶⁻²²⁸ y modulando la expresión y síntesis de CD39, lo que en última instancia afecta a la diferenciación de células Tr1. De forma adicional, la activación de AhR por ITE inhibe la polarización Th17 y promueve su conversión en células Tr1 anti-inflamatorias y productoras de IL-10²²⁹⁻²³¹.

Por lo que se refiere a células dendríticas, el efecto de la activación de AhR en este linaje celular es fundamentalmente anti-inflamatorio/inmunosupresor, lo que se ha evidenciado en modelos de colitis con eliminación selectiva de AhR (ratones Cd11c-Cre Ahr^{fl/fl})²³² y en estudios de rechazo de injertos de islotes pancreáticos en los que se usó el agonista de AhR VAF347²³³. De hecho, este compuesto provoca la diferenciación de células dendríticas de carácter tolerogénico, caracterizadas por una expresión disminuida de CD85, HLA-DR e IL-6²³³⁻²³⁵ y con menor capacidad de promover la diferenciación de células Th17 y su patogenicidad²³⁶. De igual manera, la activación de AhR aumenta la expresión de IDO1 en células dendríticas, lo que resulta en la producción de kynurenina y favorece la inducción de células Treg promovidas por TGFβ²³⁷⁻²⁴⁰. Sin embargo, también se han descrito efectos pro-inflamatorios de AhR en células dendríticas, tanto tras su tratamiento con el ligando TCDD²⁴¹ como tras el análisis del efecto de ligandos derivados del metabolismo del triptófano²⁴².

3.4 AhR en macrófagos.

Aunque se ha reportado la inducción AhR-dependiente de moléculas pro-inflamatorias (IL-1β, TNF, IL-8, CCL1, COX-2) en macrófagos²⁴³, la mayoría de estudios revelan que la activación de AhR en macrófagos tiene un efecto anti-inflamatorio. Así, los macrófagos peritoneales de ratones *Ahr* KO producen niveles elevados de citoquinas inflamatorias tras su activación, mientras que su producción de IL-10 está disminuida. De hecho, los ratones *Ahr*^{-/-} sucumben rápidamente al choque séptico inducido por LPS²²⁰. En línea con estos datos, AhR aparece como un mediador clave para la producción de IL-10 ya que la estimulación con TCDD aumenta la expresión de IL-10 inducida por LPS²⁴⁴, y este efecto se suprime en presencia del antagonista de AhR, α-naftoflavona²⁴⁵. Por otro lado, la activación del AhR con benzopireno (B(a)P) altera negativamente la generación de macrófagos adherentes diferenciados en presencia de GM-CSF, así como capacidad de secreción de TNF en respuesta a LPS y la expresión de marcadores fenotípicos como CD11a, CD71, CD80, CD86 y CD64²⁴⁶. En consecuencia, la activación de AhR tiene efectos anti-inflamatorios en macrófagos.

Por otra parte, AhR también participa en el proceso de diferenciación de precursores monocíticos a células de Langerhans y macrófagos²⁴⁶, y su acción parece ligada a la inhibición de la síntesis de PU.1. Más recientemente, AhR se ha descrito como un factor que promueve la diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos y a expensas de la diferenciación de macrófagos, si bien el sistema de diferenciación *in vitro* requería la presencia de IL-4 y TNF²⁴⁷. De hecho, y en contradicción con estos resultados, estudios previos han revelado que la inhibición de AhR con StemRegenin-1 provoca la expansión y diferenciación de células dendríticas plasmacitoides y mieloides a partir de células progenitoras CD34²⁴⁸.

Estos resultados contradictorios previos precisan de clarificación, por cuanto la identificación de estímulos endógenos con capacidad de activar AhR en macrófagos puede proporcionar información valiosa para el desarrollo de estrategias terapéuticas frente a enfermedades inflamatorias crónicas basadas en la reprogramación de macrófagos.

OBJETIVOS

- I Determinar la influencia del receptor de serotonina 5-HT_{2B} en el perfil transcripcional y funcional de macrófagos humanos diferenciados en presencia de M-CSF (M-MØ).
 - I.I Examinar los efectos transcripcionales de la serotonina que estén mediados por su interacción con 5-HT_{2B}.
 - I.II Determinar los efectos transcripcionales del agonista de 5-HT_{2B} BW723C86 en M-MØ.
 - I.III Identificar las vías de señalización específicamente inducidas por la interacción de BW723C86 con 5-HT_{2B}.
 - I.IV Examinar el efecto de BW723C86 sobre la producción de citoquinas en M-MØ estimulados con LPS.
 - I.V Valorar los posibles efectos del agonista BW723C86 independientes de su interacción con 5-HT_{2B}.

- II Determinar el papel de AhR en la diferenciación de macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de M-CSF (M-MØ).
 - II.I Evaluar el papel de AhR en M-MØ completamente diferenciadas y durante su generación a partir de monocitos en presencia de M-CSF.
 - II.II Comparar el efecto de la inhibición de AhR durante la diferenciación de GM-MØ y M-MØ.
 - II.III Determinar el efecto que la inhibición de AhR tiene sobre la producción de citoquinas inducida por LPS.
 - II.IV Analizar el efecto que la inhibición de AhR tiene sobre el estado metabólico de macrófagos M-MØ.
 - II.V Identificar alteraciones funcionales derivadas de la inhibición de AhR durante la diferenciación de M-MØ.
 - II.VI Examinar la posible regulación cruzada negativa del par AhR-HIF-1α en M-MØ.

HIPÓTESIS

El laboratorio de “Biología de las Células Mieloides” determinó previamente el efecto polarizador de la serotonina sobre macrófagos humanos, y obtuvo evidencias del papel predominante del receptor 5-HT₇ en dicha acción. El trabajo de Tesis Doctoral que aquí se presenta, en el primer capítulo, ha abordado la hipótesis, de que el receptor de serotonina 5-HT_{2B}, cuya expresión preferencial se da en macrófagos anti-inflamatorios, modifica las funciones de macrófagos de manera específica y mediante señales intracelulares diferentes a las del receptor 5-HT₇. Por otra parte, el segundo capítulo, incluye los experimentos llevados a cabo para abogar la hipótesis de que el factor transcripcional AhR condiciona la polarización anti-inflamatoria (transcripcional y funcional) de macrófagos humanos.

RESULTADOS

CAPÍTULO I:

El agonista del receptor de serotonina 5-HT_{2B} BW723C86 configura el perfil génico de macrófagos a través de AhR, e interfiere en la generación de osteoclastos a partir de monocitos humanos.

Figura 13. 5-HT incrementa la firma génica dependiente de AhR a través de 5-HT_{2B}. **A.** Análisis GSEA de la lista (ordenada por parámetro estadístico t derivado del análisis limma) de la expresión de los genes de M-MØ tratados con 5-HT frente a los valores correspondientes en M-MØ control (usando los “genes sets” denominados “AhR UP” extraído de la cita 251 y “VAF347 upregulated in DC” extraído de la cita 252), con indicación de los valores de FDR q (panel izquierdo). Representación gráfica del solapamiento génico de ambos análisis de GSEA, indicando los genes del “Leading Edge” (panel derecho). **B.** Expresión relativa de los genes indicados en M-MØ tratados con 5-HT (+) o sin tratar (-), y en ausencia o en presencia del antagonista de AhR CH-223191, añadido 1 hora antes de la adición del agonista. **C.** Expresión relativa de los genes indicados en M-MØ tratados con 5-HT (+) o sin tratar (-), y en ausencia o en presencia del antagonista de 5-HT_{2B} SB204741, añadido 1 hora antes de la adición de 5-HT. **D.** Expresión relativa de los genes indicados en M-MØ tratados con 5-HT (+) o sin tratar (-), y en ausencia o en presencia del antagonista de 5-HT₇ SB269970, añadido 1 hora antes de la adición de 5-HT (n = 4; *, p <0,05; **, p <0,01; ***, p <0,001).

Con el objetivo de validar estos resultados, se analizó la expresión de los genes anteriormente nombrados y de otros como *PDE2A* y *EREG* (ambos genes upregulados por 5-HT de manera dependiente de 5-HT₇)¹⁵⁴, así como de *IL1B* (gen controlado por AhR y de respuesta a 5-HT)²⁵³ en muestras independientes de macrófagos M-MØ tratados con 5-HT (100 µM) durante 6 horas, en presencia o ausencia del antagonista específico del factor transcripcional AhR, CH-223191 (Fig. 13B). El pretratamiento con el antagonista de AhR bloqueó el aumento de la expresión génica mediada por 5-HT en el caso de *SEMA6B*, *SERPINB2* o *CYP1B1*, que son genes directamente regulados por AhR. Por contra, la modulación de la expresión por 5-HT, de genes como *PDE2A* y *EREG* no se vio afectada en presencia del inhibidor de AhR (Fig. 13B).

De manera complementaria, con el objetivo de evaluar la contribución de 5-HT_{2B} y 5-HT₇ en la modulación de genes AhR-dependientes por 5-HT, se analizó la expresión de los genes de interés en presencia de antagonistas específicos para ambos receptores. En el caso de 5-HT_{2B}, el antagonista SB204741 presenta una selectividad de 100 veces sobre 5-HT_{2C} y 5-HT_{2A} y se usa ampliamente *in vivo*¹⁶⁹, mientras que el antagonista SB269970 es altamente selectivo para 5-HT₇²⁵⁴. El pre-tratamiento con el antagonista de 5-HT_{2B} impidió la acción de 5-HT sobre la expresión de los genes *SEMA6B*, *SERPINB2*, *CYP1B1* (Fig. 13C), que son genes diana de AhR. Por su parte, la presencia del antagonista de 5-HT₇ previno el aumento en la expresión de los genes *EREG* y *PDE2A*, ya reportados como genes upregulados por 5-HT de forma dependiente de 5-HT₇^{109,154} (Fig. 13D). En consecuencia, estos resultados indicaron que 5-HT parece activar AhR y promueve cambios génicos concretos en M-MØ a través de 5-HT_{2B}.

El agonista de 5-HT_{2B} BW723C86 modifica la expresión de genes diana de AhR.

Para diseccionar de manera precisa los efectos de la estimulación de 5-HT_{2B}, se utilizó el agonista sintético BW723C86 (Fig. 14A), molécula que presenta una alta selectividad por 5-HT_{2B}²⁵⁵. Esta molécula, de uso muy extendido *in vivo*^{170,172,256-259} y *ex vivo*^{124,260}, y que posee efectos terapéuticos prometedores¹⁶⁸, modificó el perfil génico global de macrófagos M-MØ, aumentando la expresión de 357 genes y disminuyendo la expresión de 398 genes anotados (adj p <0,002) (Fig. 14B). Sorprendentemente, y en comparación con la modulación génica producida por 5-HT, BW723C86 aumentó significativamente la expresión de genes asociados con la polarización de macrófagos de carácter pro-inflamatorio y anti-inflamatorio^{106,261} algo no observado hasta ahora, lo que indica que la activación de 5-HT_{2B} o 5-HT₇ en macrófagos M-MØ humanos desencadena diferentes resultados transcripcionales.

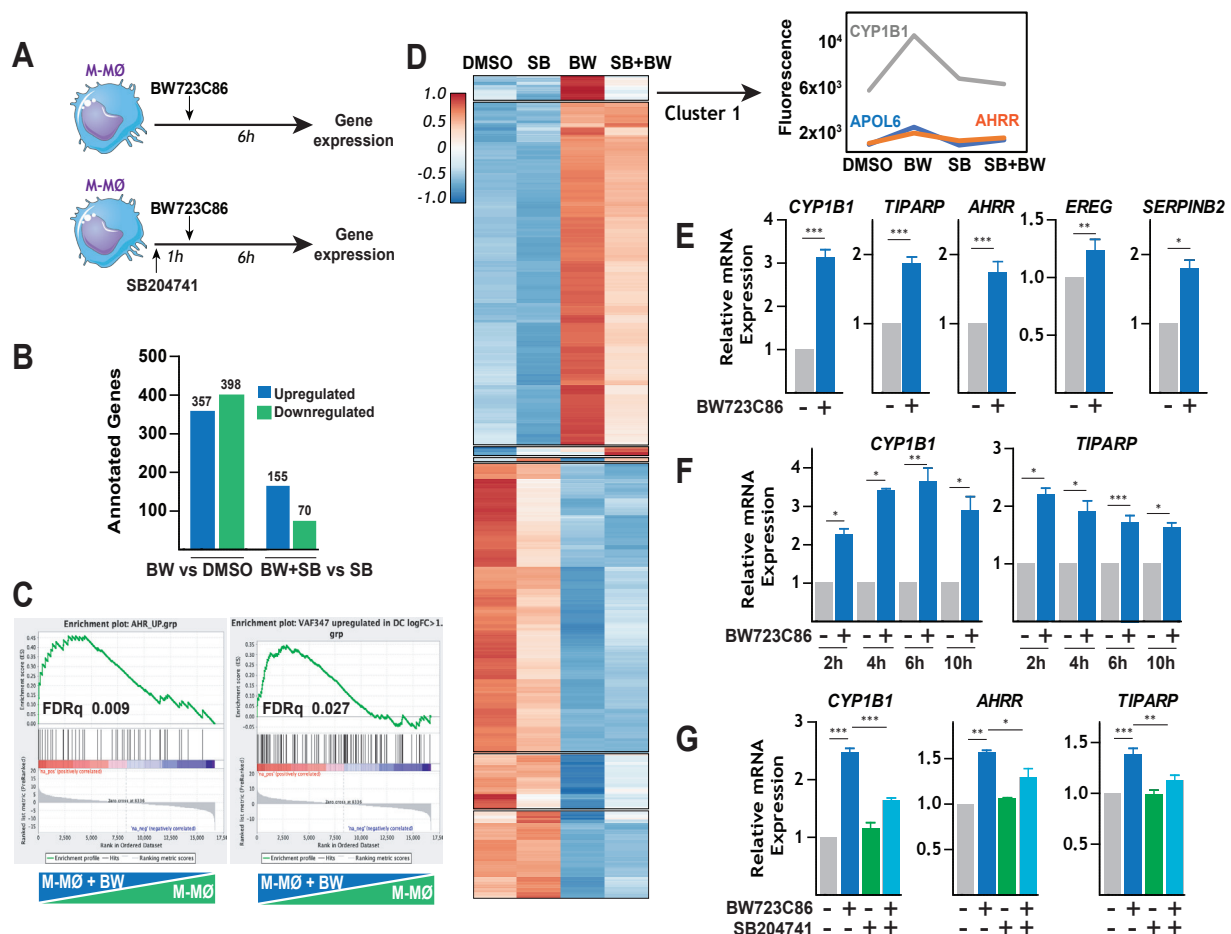


Figura 14. El agonista de 5-HT_{2B} BW723C86, modifica la firma génica de M-MØ humanos. **A.** Diseño experimental. **B.** Número de genes anotados cuya expresión es significativamente (adj $p < 0,002$) regulada al alza (UP) o a la baja (DOWN) en M-MØ después de la exposición a BW723C86 (BW, 6h), en ausencia (BW vs Control (CNT)) o presencia de SB204741 (SB) (BW + SB vs SB). **C.** Análisis GSEA de la lista clasificada por t de la expresión génica en M-MØ tratados con BW723C86 frente a la expresión en M-MØ control, utilizando los “gene set” extraídos de la referencia 251 (panel izquierdo) y 252 (panel derecho). Los valores de FDRq se muestran en la parte superior de cada panel. **D.** Agrupación jerárquica no supervisada usando ClustVis (<https://bit.cs.ut.ee/clusvis/>) del nivel de expresión medio de los genes significativamente (adj $p < 0,002$) regulado por BW723C86. Para el primer cluster, se muestra el patrón de expresión de tres genes representativos. **E.** Expresión relativa de los genes indicados en M-MØ no tratado (-) y tratado con BW723C86 (6h) (+) ($n = 7-11$; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). **F.** Expresión relativa de *CYP1B1* y *TIPARP* en M-MØ no tratados (-) y tratados con BW723C86 (+) durante los períodos de tiempo indicados (de 2h a 10h) ($n = 3$; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). **G.** Expresión relativa de *CYP1B1*, *AHRR* y *TIPARP* en M-MØ no tratado (-) o tratados durante 6 h con BW723C86, SB204741 o ambos (+) ($n = 5$; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). **(D-G)** Los resultados se muestran como la expresión de cada gen después de los diferentes tratamientos y en relación con su expresión en muestras control (no tratadas). En todos los casos se muestran la media y SEM (error estándar de la media).

El análisis de GSEA del transcriptoma de M-MØ tratados con BW723C8 (frente a los no tratados) reveló un enriquecimiento positivo del conjunto de genes “Ahr_UP”²⁵¹, y “VAF347 upregulated in DC”²⁵², con valores de FDRq=0.009 y FDRq=0.027 respectivamente (Fig. 14C). Además, dicho enriquecimiento no se observó en el transcriptoma de M-MØ tratados con BW723C8 en presencia del antagonista de 5-HT_{2B} SB204741, lo que revela que la acción del BW723C86 sobre esta firma génica es dependiente de su interacción con 5-HT_{2B}. Este resultado sugiere, por tanto, que las modificaciones transcripcionales provocadas por el agonista de 5-HT_{2B} BW723C86 están parcialmente mediadas por el factor de transcripción AhR, al igual que ocurre con el caso de 5-HT (Fig. 13B). De hecho, el conjunto de genes modulados por BW723C86 vía 5-HT_{2B} incluyeron genes diana clásicos de AhR como *AHRR* y *CYP1B1*²⁶¹, así como genes regulados por los agonistas de AhR Benzopyrene o VAF-347^{251,252} y cuyas regiones reguladoras son reconocidas por AhR (<http://iregulon.aertslab.org>).

Tomando estos datos como base, procedimos a la evaluación de la capacidad de BW723C86 de regular la expresión de otros genes de respuesta a xenobióticos, comprobando que la exposición a BW723C86 regula

significativamente al alza otros genes diana de AhR, como *SERPINB2*, *TIPARP* y *EREG*^{251,252} (Fig. 14E), incremento que se comprobó incluso 2 horas tras la adición de BW723C86 (Fig. 14F). Finalmente, y para verificar las hipótesis sugeridas por el análisis GSEA, se evaluó el aumento en la expresión de genes diana de AhR por BW723C86 en presencia y ausencia del antagonista específico de 5-HT_{2B} SB204741, y se comprobó que la modulación al alza en la expresión de estos genes fue abolida tras el pretratamiento con dicho antagonista (Fig. 14G).

De forma global, todos estos resultados nos permitieron concluir que BW723C86 regula positivamente la expresión de genes diana de AhR en macrófagos humanos a través de su interacción con 5-HT_{2B}.

BW723C86 modula el efecto del LPS sobre el perfil génico y la producción de citoquinas por macrófagos M-MØ.

El análisis por GSEA del perfil de macrófagos estimulados con BW723C86 también reveló un enriquecimiento negativo de los conjuntos de genes “TNF_Signaling_via_NFKB” e “Inflammatory_Response”, por lo que decidimos determinar la capacidad del agonista de alterar la respuesta a LPS de M-MØ (Fig. 15A). En condiciones basales, BW723C86 no modificó la producción de citoquinas en macrófagos M-MØ (Fig. 15B). Sin embargo, y tras estimular con LPS, se observaron cambios significativos en la producción de TNF α , que disminuyó sus niveles, así como un aumento en la liberación de CCL2 (Fig. 15B). El tratamiento con α -metil-serotonina (AMS)(10 μ M), agonista menos selectivo de 5-HT_{2B}²⁶², mostró una tendencia similar, si bien no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos. También se evaluó la producción de IL-10 y CXCL10, comprobándose que BW723C86 no modifica la producción de ambas citoquinas inducida por LPS (Fig.1 Suplementaria).

En este punto es importante destacar que los efectos de BW723C86 sobre la producción de citoquinas en M-MØ estimulados con LPS se vieron atenuados por SB204741 (Fig. 12B), confirmando que la modificación del perfil de citoquinas inducida por LPS por parte de BW723C86 es dependiente de 5-HT_{2B}.

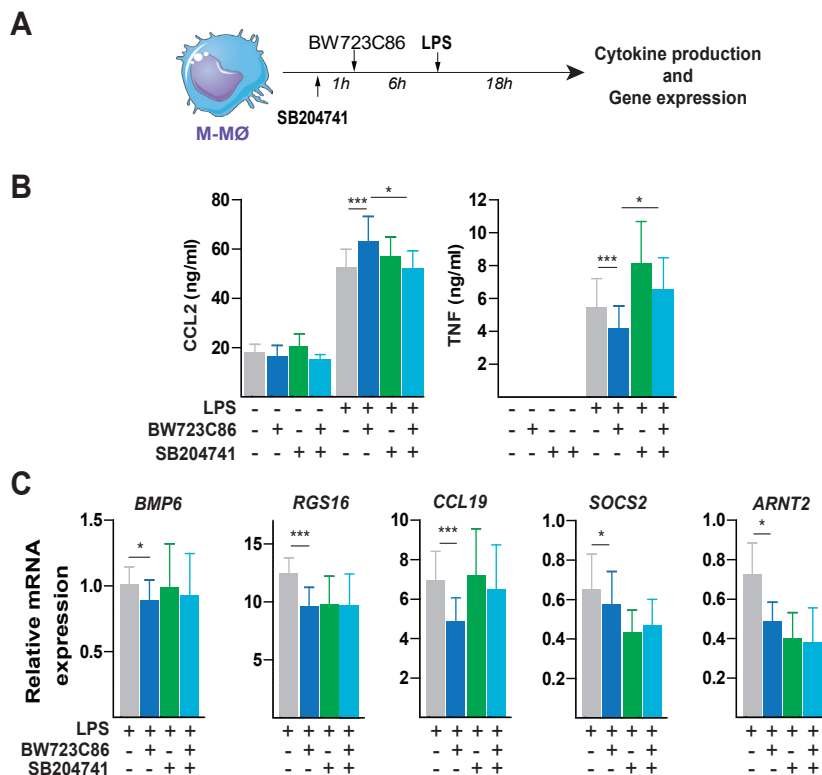


Figura 15. BW723C86 condiciona el patrón de expresión de citoquinas y expresión génica de M-MØ en respuesta a LPS. A. Diseño experimental. B. Producción de CCL2 y TNF por M-MØ estimulados con LPS (18h) no tratados (-) o pre-tratados (6 h) con BW723C86, SB204741 o ambos (+). Se muestran la media y SEM de 10/12 experimentos independientes (*, p <0,05; ***, p <0,001). C. Expresión de los genes indicados en M-MØ estimulados con LPS (4h) no tratados (-) o pre-tratados (6 h) con

BW723C86, SB204741 o ambos (+), según lo determinado por qRT-PCR. Los resultados se expresan como el nivel de ARNm de cada gen en relación con el nivel de ARNm de TBP en la misma muestra. Se muestra la media y SEM de 6 experimentos independientes (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$).

En este sentido, se pudo comprobar también que el tratamiento con BW723C86 inhibe significativamente la inducción de genes específicamente regulados por LPS en M-MØ (GSE99056)²⁶³, y que este efecto se inhibió por el antagonista de 5-HT_{2B} SB204741 (Fig. 15C). Todos estos resultados nos permitieron concluir que BW723C86 condiciona la capacidad de respuesta a LPS de macrófagos M-MØ a través de 5-HT_{2B}.

BW723C86 promueve la activación transcripcional de AhR en macrófagos humanos.

En línea con lo anteriormente comentado, BW723C86 fue capaz de modular al alza la expresión del gen *CYP1B1*, diana prototípica de AhR, y el efecto de dicho agonista se observó con concentraciones comprendidas entre 0,1 y 100µM (Fig. 16A). Con objeto de determinar la implicación directa de AhR en los efectos de BW723C86 se siguieron diferentes estrategias. En primer lugar se empleó el antagonista de AhR CH-223191²⁶⁴, observándose que su presencia previene la inducción de la expresión de *CYP1B1* y *TIPARP* causada por BW723C86 (Fig. 16B). En paralelo, y como control positivo, se comprobó que la expresión de ambos genes aumenta significativamente tras el tratamiento de M-MØ con el agonista de AhR FICZ (Fig. 16B). Posteriormente, se evaluó el efecto del silenciamiento de AhR sobre los efectos causados por BW723C86. Como se observa en la Fig. 16C-D, el silenciamiento de AhR empleando un siRNA específico bloqueó la upregulación de *CYP1B1* y *TIPARP* promovida por BW723C86 (Fig. 16E). Finalmente, procedimos a evaluar el estado de activación transcripcional de AhR tras el tratamiento con BW723C86 empleando un gen “reporter” en el que la expresión de la luciferasa de luciérnaga se encuentra bajo el control de secuencias de reconocimiento para AhR (secuencias XRE). Los resultados de dichos ensayos indicaron que BW723C86 potencia específicamente la actividad transcripcional de AhR en M-MØ, y que dicho efecto se previene por el antagonista de AhR CH-223191 (Fig. 16F). Por lo tanto, se puede concluir que BW723C86 aumenta la actividad transcripcional de AhR en macrófagos humanos M-MØ, y que dicho efecto depende de 5-HT_{2B}, desencadenando una expresión regulada al alza de los genes diana de AhR.

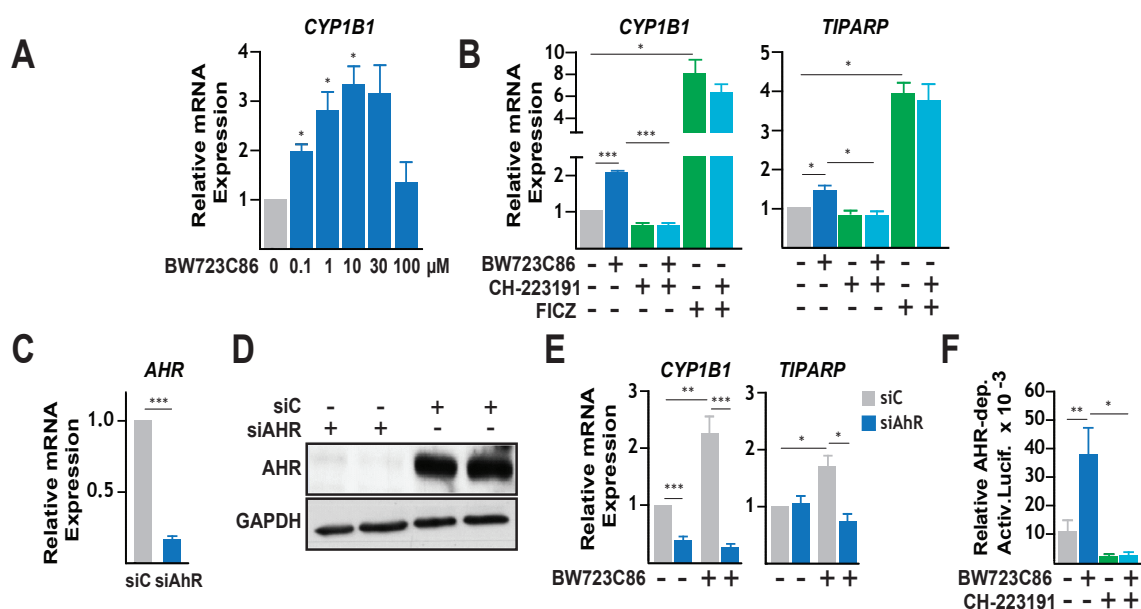


Figura 16. La regulación positiva de *CYP1B1* por BW723C86 depende de 5-HT_{2B} y requiere de la activación de AhR. **A.** Expresión relativa de *CYP1B1* en M-MØ no tratados (0) o tratados durante 6 h con las concentraciones indicadas de BW723C86 (entre 0,1 y 100 µM) (n = 3; *, $p < 0,05$). **B.** Expresión relativa de *CYP1B1* y *TIPARP* en M-MØ sin tratar (-) o tratados durante 6 h con BW723C86 (BW) en ausencia o presencia (+) del antagonista de AhR, CH-223191. En paralelo se trató a los M-MØ con FICZ, agonista de AhR (6h), como control positivo del experimento. Los resultados se muestran como la expresión de cada gen después de los diferentes tratamientos y en relación con su expresión en muestras control (no tratadas). En todos los casos, se muestran la media y la SEM (n = 4; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,0001$). **C-D.** mRNA de *AHR* (C) y nivel de proteína AhR (D) en M-MØ transfectados con siRNA control (siC) o con siRNA específico de *AHR* (siAhR). Se realizaron seis experimentos independientes para la determinación del mRNA de *AHR* mediante qRT PCR (C) (n = 6; ***, $p < 0,001$). Se muestran los Westerns Blot de dos

experimentos de silenciamiento independientes (D). E. Expresión relativa de *CYP1B1* y *TIPARP* en M-MØ transfectados con siRNA control (siC) o siRNA específico de AhR (siAhR), y sin tratar (-) o tratados durante 6 h con BW723C86 (+) (n = 6; * p <0,05; **, p <0,01; ***, p <0,001). En A-E, los resultados se muestran como la expresión de cada gen después de los diferentes tratamientos y en relación con su expresión en muestras de control (no tratadas). En todos los casos se muestran la media y SEM. F. Actividad transcripcional dependiente de AhR en M-MØ transfectados con la construcción XRE-Luc, sin tratar (-) o tratados con BW723C86 (14h), y en ausencia o en presencia del antagonista de AhR CH-223191, añadido 1 hora antes de la adición del agonista. Se muestran la media y la SEM de la actividad luciferasa dependiente de AhR de cinco experimentos independientes (n = 5; *, p <0,05; **, p <0,01).

BW723C86 también induce la activación transcripcional de AhR en la línea de hepatocarcinoma humano HepG2.

Dado que la línea de hepatocarcinoma humano HepG2 expresa 5-HT_{2B}¹⁶⁷, se utilizó dicha línea celular para corroborar el efecto de BW723C86 sobre la activación de AhR observada en macrófagos anti-inflamatorios M-MØ. La estimulación con BW723C86 indujo la upregulación de la expresión de *CYP1B1* en HepG2 tras 4-6 horas de tratamiento (Fig. 17A). Además, la activación transcripcional de AhR causada por BW723C86 se redujo o previno (dependiendo de la concentración) en presencia del antagonista de 5-HT_{2B} SB204741 (Fig. 17B) y en presencia del antagonista de AhR CH-223191 (Fig. 17C).

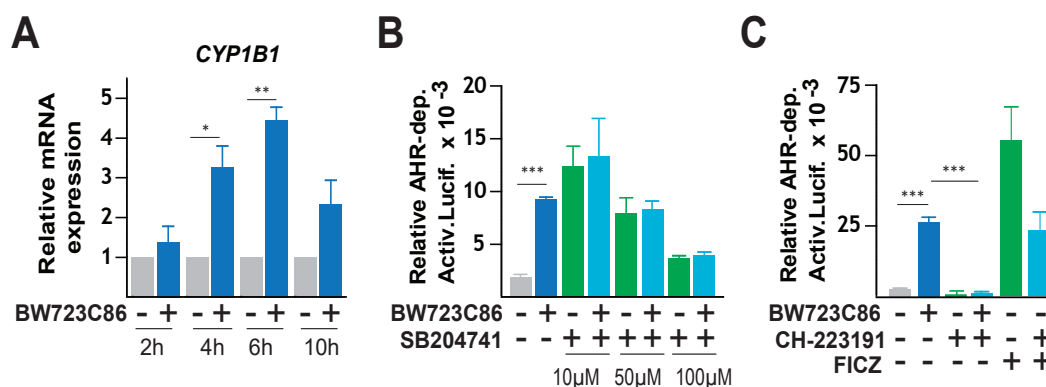


Figura 17. La regulación positiva de *CYP1B1* por BW723C86 depende de 5-HT_{2B} y requiere la activación de AhR en células HepG2. A. Expresión relativa de *CYP1B1* en células de hepatoma HepG2 no tratadas (-) o tratadas con BW723C86 (+) durante los períodos de tiempo indicados (n = 3; *, p <0,05; **, p <0,01). B. Valores de la actividad transcripcional dependiente de AhR en células HepG2 transfectadas con XRE-Luc, sin tratar (-) o tratadas con BW723C86 (16h), y en ausencia o en presencia de las concentraciones indicadas del antagonista de 5-HT_{2B} SB204741 (n = 4; ***, p <0,001). C. Medida de la actividad transcripcional dependiente de AhR en células HepG2 transfectadas con XRE-Luc no tratadas (-) o tratadas con BW723C86 (+) (16h), y en ausencia o presencia del antagonista de AhR CH-223191, que se añadió 1 hora antes de la adición del agonista. Las células HepG2 se trataron con FICZ como control positivo en el experimento (n = 4; ***, p <0,001).

En paralelo, y como control adicional, se comprobó que la expresión de *CYP1B1* aumenta significativamente tras el tratamiento de las células HepG2 con el agonista de AhR FICZ (Fig.17C). De forma global, esta serie de experimentos verificaron la acción del BW723C86 sobre el aumento de la actividad transcripcional de AhR, y que dicha acción está mediada por su interacción con 5-HT_{2B}.

Análisis del perfil génico de macrófagos derivados de precursores de médula ósea procedentes de ratones Htr2b KO.

A continuación, evaluamos si los datos observados en macrófagos humanos eran extrapolables al caso de macrófagos de ratón derivados de precursores de médula ósea en presencia de M-CSF. Para ello hicimos uso de la cepa *Htr2b* KO, que fue proporcionada por el Dr. Luc Maroteaux (INSERM, Institut du Fer à Moulin, Paris, Francia). Como se puede observar en la Fig. 18A, el tratamiento de los macrófagos murinos M-MØ con BW723C86 o 5-HT (6 horas) no modificó de forma significativa la expresión de los genes *Ahr* y *Cyp1b1*. Este resultado indica que los efectos de BW723C86 y 5-HT sobre AhR en M-MØ humanos no pueden extrapolarse al caso de M-MØ murinos, al menos en el caso de macrófagos derivados de médula ósea

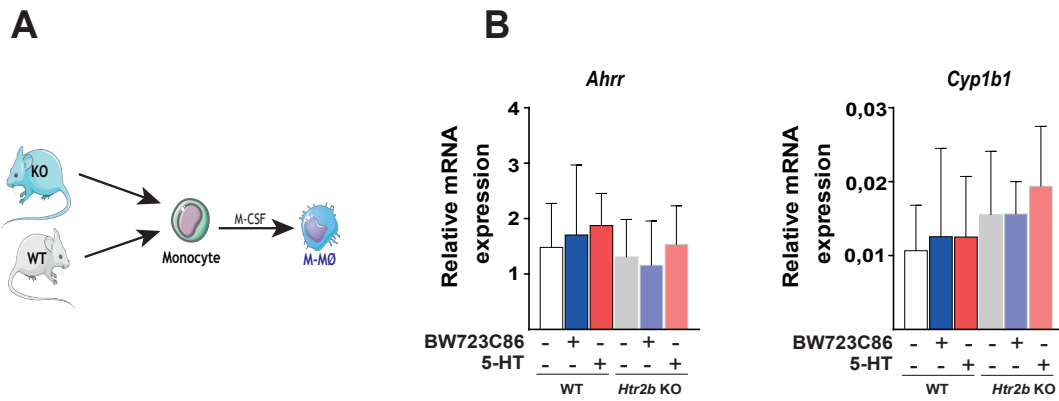


Figura 18. Análisis de la modulación génica inducida por BW723C86 en ratones *Htr2b* KO. A. Modelo experimental. B. Análisis de la expresión génica de *Cyp1b1* y *AhRR* en M-MØ eMØ derivados de precursores de medula ósea de ratones control (WT) y ratones *Htr2b* KO (KO), tras su estimulación con BW723C86 o 5-HT (10µM) (6h) (n=2-3).

Los ligandos de 5-HT_{2B} AMS y 6-APB también aumentan la expresión de genes diana de AhR en M-MØ.

Para obtener evidencias adicionales de la implicación de 5-HT_{2B} en la capacidad de BW723C86 de promover la activación de AhR, se decidió analizar la influencia de dos agonistas adicionales de 5-HT_{2B}, 6-APB (6-(2-amino-propil)benzofurano) y AMS, (α -metil-serotonina)^{262,265} sobre la expresión de genes diana de AhR. Aunque en menor medida que BW723C86, el agonista selectivo de 5-HT_{2B} 6-APB incrementó la expresión de *CYP1B1* en M-MØ a concentraciones de 10nM-1µM (Fig. 19A). Del mismo modo, AMS incrementó la expresión de *CYP1B1* de una manera dependiente de la dosis, siendo su efecto abolido por el antagonista SB204741 (Fig. 19B).

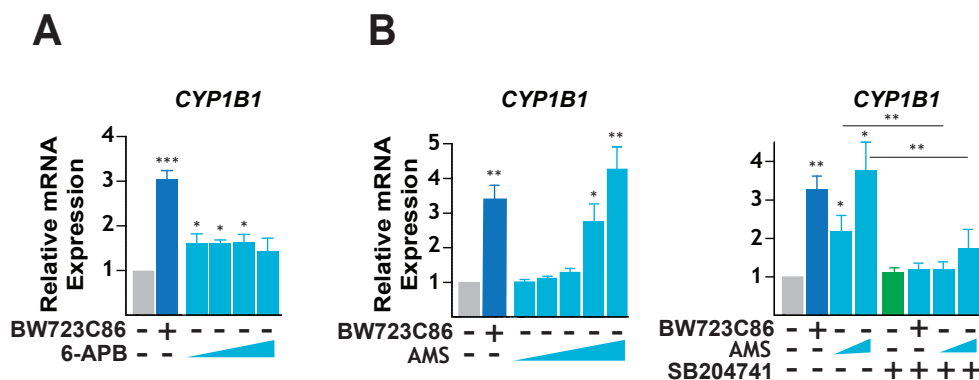


Figura 19. La activación de AhR en M-MØ se produce también en respuesta a otros agonistas de 5-HT_{2B}. A. Expresión relativa de *CYP1B1* en M-MØ tratados durante 6 h con DMSO (vehículo, -), BW723C86 (+) o con concentraciones crecientes de 6-APB (10 nM, 50 nM, 100 nM o 1 µM) (n = 9). B. Expresión relativa de *CYP1B1* en M-MØ no tratados (-), tratados con BW723C86 durante 6 h (+) o con concentraciones crecientes de α -metil-5-HT (AMS) (10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 µM o 500 µM) (panel izquierdo)(n = 6), en ausencia o presencia de SB204741 utilizando AMS 100 µM o 500 µM (panel derecho)(n = 4). Los resultados se muestran como la expresión de cada gen después de los diferentes tratamientos y en relación con su expresión en muestras de control (no tratadas). Se muestran la media y SEM (p <0,05; **, p <0,01; ***, p <0,001).

Por lo tanto, otros agonistas selectivos para 5-HT_{2B} son capaces de incrementar la expresión de genes diana de AhR de una manera dependiente de 5-HT_{2B} en macrófagos humanos.

Análisis de las vías de señalización que median el efecto de 5-HT_{2B} sobre la activación de AhR.

Para determinar las moléculas efectoras que median la influencia de 5-HT_{2B} sobre AhR y diseccionar las vías de señalización intracelular moduladas por BW723C86 en M-MØ, se procedió a inhibir la acción de moléculas previamente implicadas en las señales intracelulares disparadas por la activación de 5-HT_{2B}¹⁴⁸. Para ello tratamos a los macrófagos M-MØ con antagonistas selectivos para PLC (U73122)²⁶⁶, PKC (GO-6976)²⁶⁷, Proteína G/q11 (D-TRp-Substance)²⁶⁸, B-Raf (Vemurafenib)²⁶⁹ y Src (Saracatinib)²⁷⁰, y a continuación los M-MØ se expusieron a BW723C86 (6h) antes de evaluar la expresión del gen diana de AhR *CYP1B1*. La presencia de antagonistas específicos de G/q11 y B-Raf no afectó al aumento en la expresión de *CYP1B1*

inducido por el tratamiento con BW723C86, lo que sugiere que dichas moléculas no están implicadas en la señalización intracelular causada por la interacción de BW723C86 con 5-HT_{2B} y en la posterior activación de AhR (Fig. 20A). Sin embargo, los inhibidores de PLC, PKC y Src alteraron el aumento en la expresión de *CYP1B1* causado por BW723C86, lo que sugiere su participación en la conexión 5-HT_{2B}-AhR.

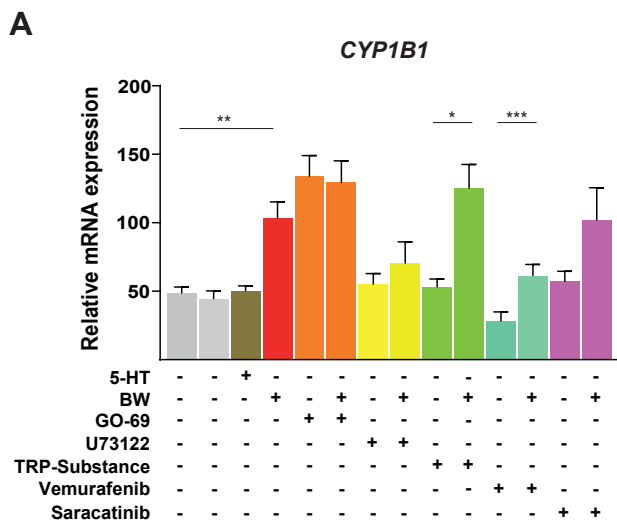


Figura 20. Estudio de las posibles vías de señalización de BW723C86 a través de 5-HT_{2B}. A. Análisis de la expresión génica de *CYP1B1* en M-MØ no tratados (-) y tratados con BW723C86 (6 h) (+), en los cuales previamente se realizó un tratamiento (1h) con antagonistas específicos para; PLC (U73122), PKC (GO-6976), Proteína G/q11 (D-TRp-Substance), B-Raf (Vemurafenib), Src (Saracatinib). (n = 3. *, p <0,05; **, p <0,01; ***, p <0,001).

Efectos de BW723C86 independientes de 5-HTR_{2B}: bloqueo de la diferenciación de osteoclastos.

El análisis del efecto transcripcional de BW723C86 sobre M-MØ reveló que, en presencia del antagonista SB204741, BW723C86 es capaz de modular de forma significativa (adj p <0,002) la expresión de 225 genes anotados, 155 al alza y 70 a la baja (Fig. 14B). Así mismo, la comparación de los cambios transcripcionales inducidos por BW723C86 en ausencia o presencia del antagonista (Fig. 21B) reveló que el antagonista SB204741 previene la regulación positiva mediada por BW723C86 de 217 genes, y la disminución de 334 genes. Por tanto, 5-HT_{2B} media la expresión aumentada del 60% de los genes upregulados por BW723C86 y el descenso en la expresión del 84% de los genes downregulados por BW723C86. En consecuencia, BW723C86 modula la expresión de 207 genes (140 regulados al alza y 67 a la baja) en presencia del antagonista de 5-HT_{2B}. Estos resultados sugirieron la existencia de cambios transcripcionales inducidos por BW723C86 que son independientes de 5-HT_{2B} (al no ser inhibidos por SB204741). Mediante el empleo de “Volcano plot”, que combinan la expresión diferencial (“fold change”) y la significación estadística, y donde cada gen está representado por un punto, se observó que mientras la regulación positiva de *CYP1B1* y *AHRR* por BW723C86 se previene por SB204741, los efectos de BW723C86 sobre la expresión de genes como *ENG* o *APOL6* no se modifican en presencia del antagonista de 5-HT_{2B} (Fig. 21A). La disminución de la expresión de *OCSTAMP* causada por BW723C86 es una de las alteraciones que no se afectan por la presencia del antagonista de 5-HT_{2B} SB204741 (Fig. 21C). Por otro lado, los cambios inducidos por BW723C86 en la expresión de *EGR1* y *OCSTAMP* tampoco se vieron afectados por el pre-tratamiento con el antagonista de AhR CH-223191 (Fig. 21C). En consecuencia, estos resultados sugieren la existencia de cambios transcripcionales inducidos por BW723C86 que son independientes de AhR y de 5-HT_{2B}.

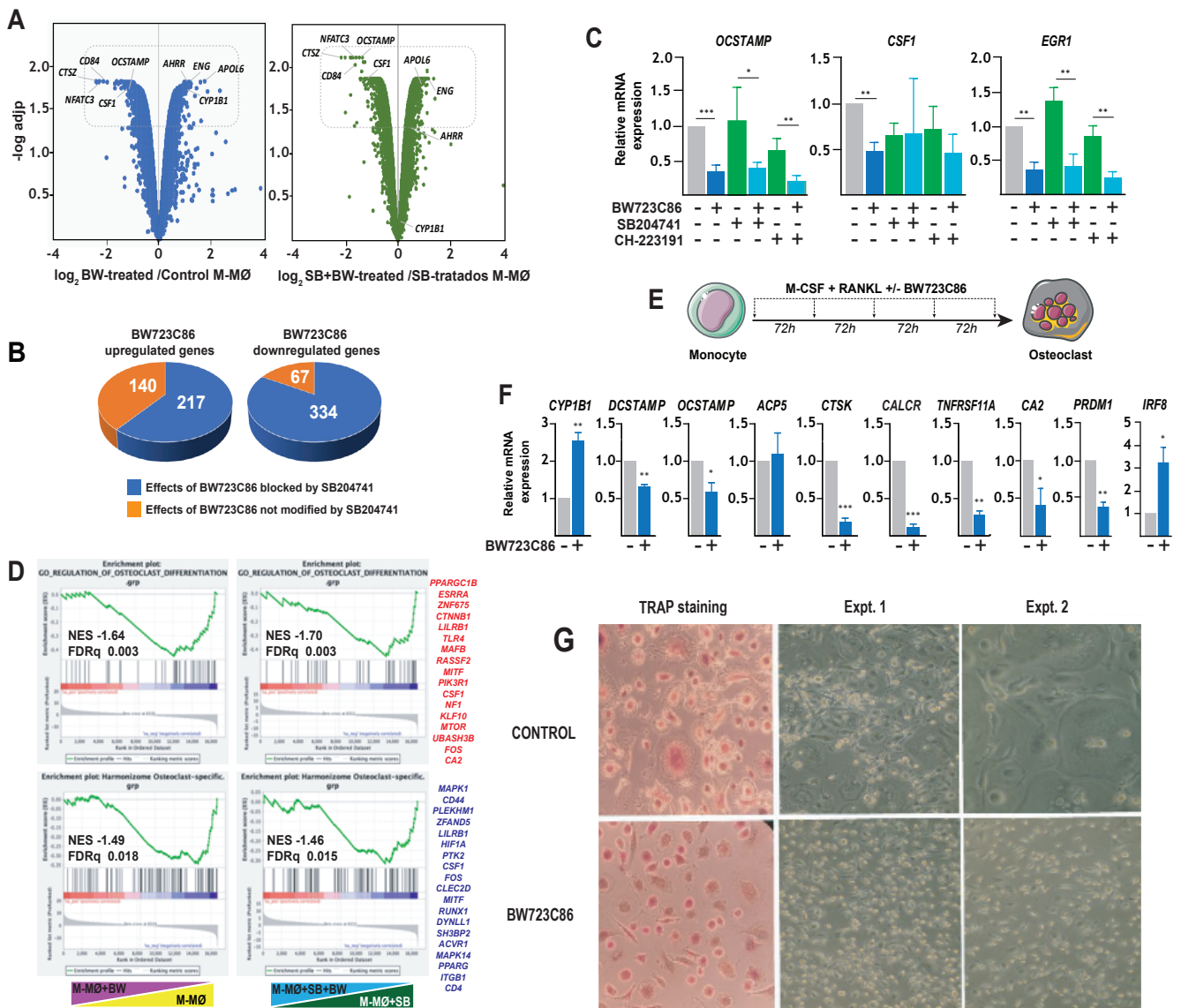


Figura 21. BW723C86 y sus acciones independientes de 5-HT_{2B}: Efecto en la diferenciación de monocitos a osteoclastos. A. Representación “Volcano plot” de los perfiles de expresión génica de M-MØ tratados con BW vs M-MØ Control (panel izquierdo) y M-MØ tratados con BW+SB vs M-MØ tratados con SB (panel derecho), en base a log₂ Fold Change (eje X) y log adjp (eje Y). En ambos paneles, el área punteada incluye los genes con adjp <0,05. Algunos de los genes expresados diferencialmente en cada caso están indicados (cabe reseñar la posición relativa distinta de *CYP1B1* y *AHRR*). **B.** Número de genes anotados sensibles a SB204741 (azul) e insensibles a SB204741 (naranja) dentro del grupo de genes significativamente (adj p <0,002) regulados al alza por BW723C86 (BW723C86>Control, panel izquierdo) o regulados a la baja (BW723C86<Control, panel derecho). **C.** Expresión relativa de los genes indicados en M-MØ no tratados (-) o M-MØ tratados durante 6 h con BW723C86 después de un tratamiento previo (1h) con SB204741 o CH-223191 (n = 5; ***, p <0,001) (B-C). Los resultados se muestran como la expresión de cada gen después de los diferentes tratamientos y en relación con su expresión en muestras control (no tratadas). En todos los casos se muestran la media y SEM. **D.** Análisis GSEA de la expresión de cada gen en M-MØ +BW723C86 frente a su expresión en M-MØ, (panel izquierdo) o en M-MØ+SB204741+BW723C86 frente a su expresión en M-MØ+SB204741 (panel derecho), empleando el parámetro t para dicha comparación. Los valores de FDR q para los conjuntos de genes mostrados se indican en cada panel. **E.** Modelo gráfico de la diferenciación de monocitos a osteoclastos con M-CSF y RANK-L durante 12 días en presencia o ausencia de BW723C86. **F.** Expresión de los genes indicados analizados en osteoclastos derivados de monocitos en ausencia (-) o presencia de BW723C86 (+) (n = 4; *, p <0,05; ** p <0,01; ***, p <0,001). Los resultados se muestran como la expresión de cada gen en células tratadas con BW723C86 y en relación con su expresión en muestras de control (no tratadas). En todos los casos se muestran la media y la SEM. **G.** Tinción TRAP (panel izquierdo) de monocitos no tratados (CONTROL) o tratados con BW723C86 (BW723C86) cultivados durante 12 días en presencia de M-CSF y RANKL para la diferenciación a osteoclastos. La microscopía de contraste de fase de dos experimentos independientes (Ext. 1 y Expt2) se muestra en el panel derecho.

La capacidad de BW723C86 para reducir la expresión de *CSF1* (que codifica M-CSF), *EGR1* (que regula osteoclastogénesis)^{271,272} y *OCSTAMP* (que impulsa la fusión de precursores de osteoclastos)²⁷³ (Fig. 21C), junto con el enriquecimiento negativo de los grupos de genes “GO_Regulation_of_Os-

teoclast_Differentiation” y “Harmonizome Osteoclast-specific” en los transcriptomas de M-MØ tratados con BW723C86 en presencia o ausencia del antagonista (Fig. 21D), sugirieron que BW723C86 podría afectar a la diferenciación de osteoclastos (osteoclastogénesis) de forma independiente de 5-HT_{2B}.

Para evaluar esta hipótesis, se llevó a cabo la diferenciación de monocito-a-osteoclasto inducida por M-CSF+RANKL y en presencia o ausencia de BW723C86 (Fig. 21E). La presencia del agonista durante la diferenciación perjudicó significativamente la expresión de *OCSTAMP* y *DCSTAMP*, que codifican para moléculas directamente implicadas en la fusión de células para la formación de osteoclastos^{274,275}, así como la adquisición de marcadores de osteoclastos distintivos como *CTSK*, *CALCR*, *CA2* y *TNFRSF11A* (este último codifica para el receptor RANKL) (Fig. 21F). Además, la presencia de BW723C86 a lo largo de la osteoclastogénesis aumentó significativamente la expresión del gen *IRF8*, cuya proteína regula de manera negativa la diferenciación de osteoclastos^{53,276}, y simultáneamente provocó una reducción significativa en la expresión de *PRDM1*, que codifica para un represor de la expresión de los reguladores negativos de la diferenciación de osteoclastos (Blimp1)²⁷⁶ (Fig. 21F). De forma global, estos resultados transcripcionales avalan la hipótesis de que BW723C86 afecta negativamente la diferenciación de osteoclastos. Este hecho fue corroborado a nivel morfológico mediante microscopía y el empleo de la tinción osteoclasto-específica TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase), revelando ambas observaciones que la presencia sostenida de BW723C86 durante la diferenciación de osteoclastos promovida por M-CSF+RANKL previene la generación de células multinucleadas y de sus característicos “osteoclasts truffled borders” (Fig. 21G).

En base a estos resultados, proponemos que BW723C86 tiene un efecto inhibitorio sobre la capacidad de monocitos humanos para diferenciarse a osteoclastos en respuesta a M-CSF+RANKL.

RESULTADOS

CAPÍTULO II

Papel de AhR en la diferenciación de macrófagos anti-inflamatorios M-MØ humanos.

La inhibición de AhR perjudica la adquisición de la firma transcripcional de M-MØ anti-inflamatorios.

En el laboratorio se determinó con anterioridad la firma transcripcional de los macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de M-CSF (M-MØ anti-inflamatorios) o GM-CSF (GM-MØ pro-inflamatorio)^{106,277}. El análisis de GSEA de los perfiles génicos de ambos subtipos de macrófagos reveló que los macrófagos M-MØ exhiben una sobrerrepresentación significativa de los genes diana del factor transcripcional AhR, previamente identificados en macrófagos humanos expuestos al benzo(a)pireno²⁵¹ y en células dendríticas humanas expuestas a VAF347 (GSE10463)²⁵² (Fig. 22A). A la par, comprobamos una sobrerrepresentación significativa de genes regulados negativamente por la activación de AhR en el transcriptoma de GM-MØ (Fig. 22B). En conjunto, estos resultados revelaban la expresión diferencial de genes diana de AhR en M-MØ y GM-MØ, sugiriendo una activación preferencial de AhR en los M-MØ anti-inflamatorios derivados de monocitos humanos.

Para abordar el papel de AhR durante la diferenciación de monocitos a macrófagos inducida por M-CSF, primero redujimos la expresión de AhR en M-MØ completamente diferenciados mediante el uso de un RNA interferente específico para dicha molécula (Fig. 22C). Además de una disminución significativa en la proteína AhR y la expresión génica de *AHRR* y *CYP1B1*, no se encontró ningún cambio significativo en la expresión de genes específicos de M-MØ (Fig. 22C). Un resultado similar se obtuvo tras la inhibición de AhR en M-MØ completamente diferenciados con CH-223191 (Fig. 22D), donde solo la expresión de los genes diana de AhR, *AHRR* y *CYP1B1* se redujo significativamente (Fig. 22D). De forma global, estos resultados indicaron que AhR no tiene un papel importante en el mantenimiento de la firma transcripcional específica de M-MØ terminalmente diferenciados.

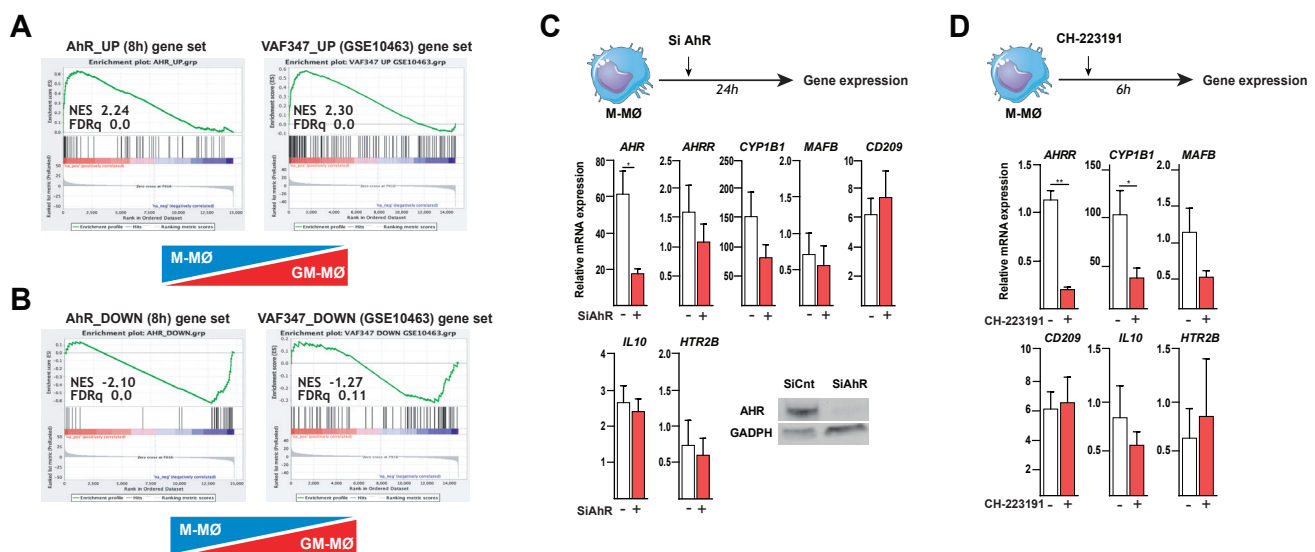


Figura 22. Relevancia de AhR en el perfil transcriptómico de macrófagos M-MØ anti-inflamatorios y GM-MØ pro-inflamatorios. A,B. GSEA del transcriptoma de M-MØ vs GM-MØ (determinados en las referencias 277 y 106) utilizando los conjuntos de genes regulados al alza (A) o a la baja (B) por el factor transcripcional AhR, y previamente identificados en macrófagos humanos expuestos al benzo(a)pireno (panel izquierdo) y en células dendríticas humanas expuestas a VAF347 (panel derecho) (referencias 251 y 252). C. Expresión relativa de los genes indicados en M-MØ transfectados con un siRNA control (-) o con un siRNA específico de AHR (siAhR, +) (n = 3; *, p < 0,05; **, p < 0,01). Se presenta también la detección por Western Blot de AhR y GAPDH en las muestras indicadas (Panel inferior). D. Expresión relativa de los genes indicados en M-MØ tratados durante 6 horas con CH-223191 (+) o no tratados (-) (n = 3; *, p < 0,05; **, p < 0,01).

Dado que el medio de cultivo contiene pequeñas cantidades de ligandos de AhR²⁷⁸, la participación de AhR en la generación de M-MØ inducida por M-CSF se evaluó mediante la inhibición sostenida de AhR a lo largo del proceso de diferenciación de monocitos a M-MØ (Fig. 23A). Para ello, utilizamos el inhibidor sintético de AhR CH-223191 (ácido-2-metil-2H-pirazol-3-carboxílico), que bloquea la translocación nuclear y la unión al DNA de AhR^{264,279}. Como se esperaba, la inhibición crónica de AhR durante la diferenciación de

monocitos a M-MØ resultó en una expresión disminuida de *AHRR* y *CYP1B1* (Fig. 23B). Además, el bloqueo de AhR perjudicó significativamente la adquisición de genes dependientes de M-CSF del “Anti-inflammatory gene set”, incluidos *HTR2B*, *FCGBP*, *CD209*, *EMR1*, *FOLR2*, *IGF1* y *SLC40A1*, y simultáneamente promovió una expresión aumentada de genes característicos de GM-MØ (*INHBA*, *CLEC5A*, *HSD11B1*, *NR1H3*)^{106,277} (Fig. 23B). Este cambio en el perfil transcripcional se verificó a nivel de proteína, ya que la presencia de CH-223191 condujo a una expresión disminuida de CD209 (Fig. 23C) y MAF (Fig. 23D), y a una expresión mejorada de LXR α (codificado por *NR1H3*) (Fig. 23E).

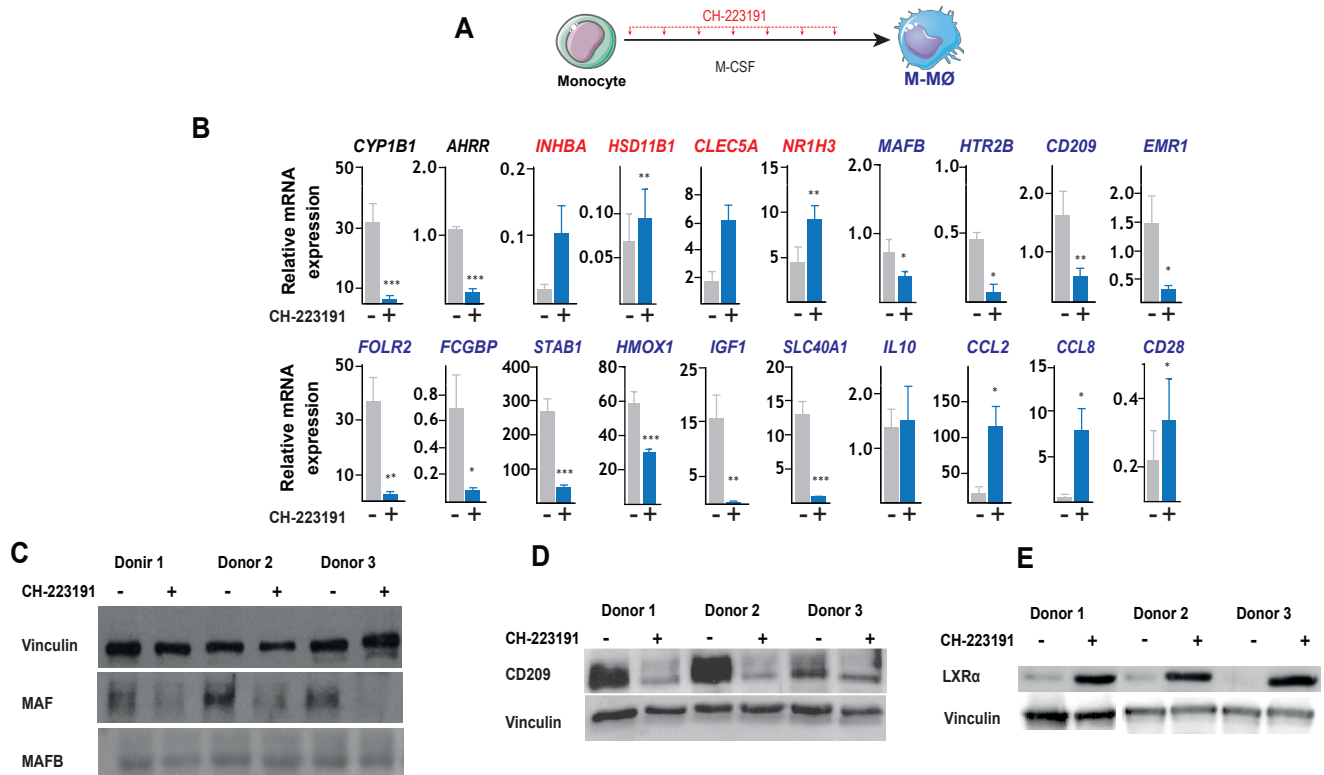


Figura 23. La inhibición de AhR perjudica a la adquisición de la firma transcripcional de M-MØ anti-inflamatorios. **A.** Representación esquemática del experimento. **B.** Expresión relativa de los genes indicados en M-MØ diferenciados en presencia de CH-223191 (+) y no tratados (-). Se indica los genes diana de AhR (negro), los genes del “Pro-inflammatory gene set” (rojo) y los genes característicos de M-MØ del “Anti-inflammatory gene set” (n = 3-6; *, p <0,05; **, p <0,01; ***, p <0,001). **C.** Detección por Western Blot de MAFB y MAF en muestras de M-MØ diferenciados en presencia (+) y ausencia (-) de CH-223191, usando Vinculina como control de carga (n = 3). **D.** Detección por Western Blot de CD209 en muestras de M-MØ diferenciados en presencia (+) y ausencia (-) de CH-223191, usando Vinculina como control de carga (n = 3). **E.** Detección por Western Blot de LXR α en muestras de M-MØ diferenciados en presencia (+) y ausencia (-) de CH-223191, usando Vinculina como control de carga (n = 3).

Por lo tanto, la inhibición de AhR durante la diferenciación mediada por M-CSF impide la adquisición del perfil transcripcional y proteico característico de M-MØ anti-inflamatorios. Por el contrario, CH-223191 tuvo un efecto menor en la generación de macrófagos GM-MØ pro-inflamatorios mediada por GM-CSF (Fig. 24A-B).

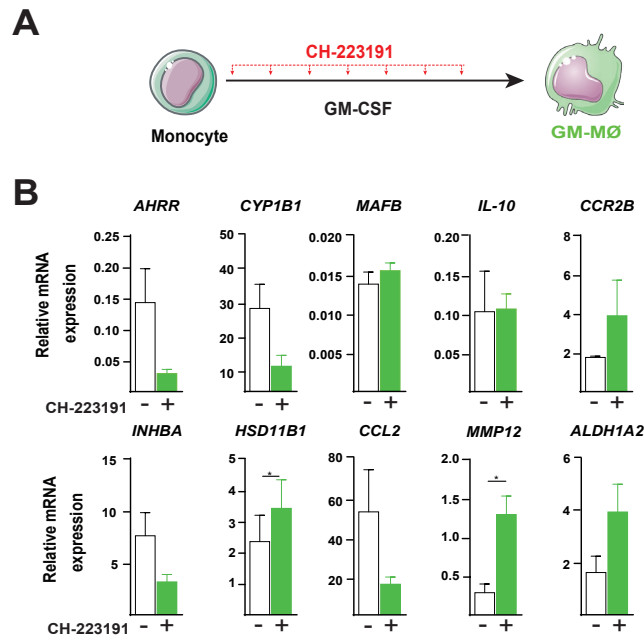


Figura 24. Efectos de la inhibición de AhR en la firma transcripcional de GM-MØ pro-inflamatorios. **A.** Representación gráfica del modelo de diferenciación usado en los ensayos. **B.** Expresión relativa de los genes indicados en GM-MØ diferenciados en presencia de CH-223191 (+) y no tratados (-) (n = 3 *, p <0,05).

La inhibición de AhR impide la adquisición del perfil de citoquinas característico de M-MØ anti-inflamatorios.

Para evaluar si la inhibición de AhR influye también en la adquisición del perfil de citoquinas características de M-MØ expuestos a estímulos patogénicos (IL10^{high}, TNF^{low}, IL6^{low}), comparamos la producción de citoquinas de M-MØ tratados con LPS y generados en ausencia o presencia de CH-223191 (Fig. 25A). La inhibición crónica de AhR resultó en un aumento significativo de la producción de TNF e IL-6 inducido por LPS, así como en una reducción significativa de la liberación de IL-10 inducida por LPS (Fig. 25B).

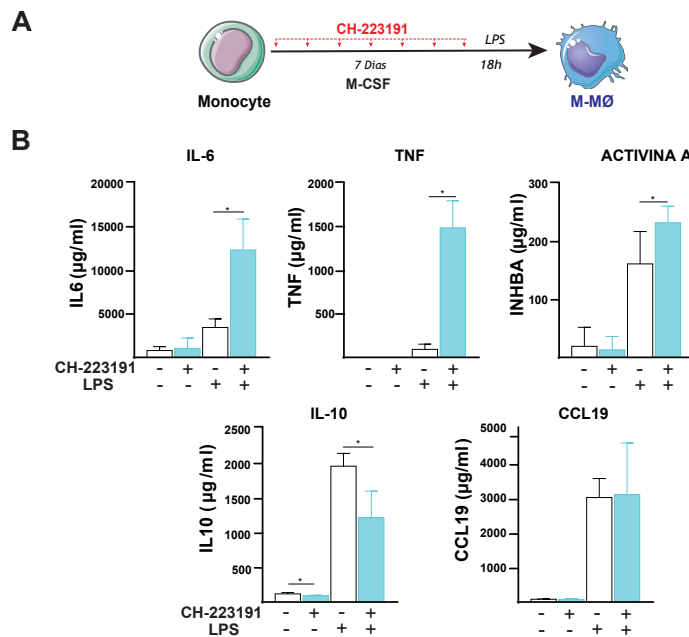


Figura 25. La inhibición de AhR impide la adquisición del perfil de citoquinas característico de M-MØ anti-inflamatorios. **A.** Diseño experimental. **B.** Determinación por ELISA de la producción de citoquinas (IL-6, TNF, Activina A, IL-10, CCL19) tratadas (+) o no tratadas(-) con LPS (18h) en M-MØ diferenciados en presencia (+) o ausencia (-) de CH-223191 (n = 6 *, p <0,05).

Por lo tanto, la inhibición de AhR a lo largo de la diferenciación de M-MØ mediada por M-CSF distorsiona el perfil de citoquinas inducido por LPS en las células resultantes y conduce a la generación de macrófagos con una capacidad pro-inflamatoria mejorada (TNF e IL-6) y una disminución de su respuesta antiinflamatoria (IL-10).

Análisis del perfil génico de macrófagos derivados de precursores de médula ósea procedentes de ratones *Ahr* KO.

Para evaluar si los resultados anteriores eran extrapolables a macrófagos de ratón, estudiamos a continuación el papel de AhR en la diferenciación de macrófagos derivados de médula ósea merced a la colaboración de la Dra. María A. Moro (Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España), que nos proporcionó la cepa de ratones *Ahr* KO.

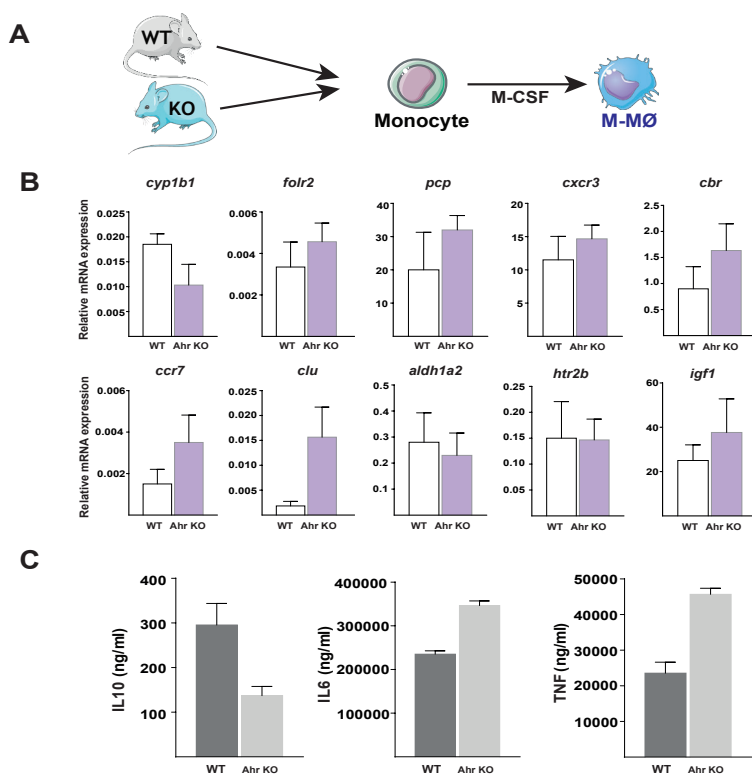


Figura 26. Análisis del perfil génico de macrófagos obtenidos de ratones *Ahr* KO. **A.** Modelo experimental. **B.** Análisis de la expresión génica de los genes indicados en M-MØ derivados de médula ósea de ratones *Ahr* KO (*Ahr* KO, barras moradas) y WT (WT, barras blancas) (n=2-3). **C.** Producción de IL-10, IL-6 y TNF en M-MØ diferenciados a partir de precursores de médula ósea de ratones control (WT) y ratones *Ahr* KO tras su estimulación con LPS (18h)(n=2-3).

Para ello analizamos un conjunto de marcadores característicos de M-MØ y GM-MØ de ratón descritos con anterioridad^{61,280}. De manera complementaria, decidimos valorar la respuesta a LPS por estas células (Fig. 25A). Los resultados indicaron que la ausencia de *Ahr* no se traduce en un cambio del perfil génico característico de los macrófagos M-MØ, no observándose un incremento de genes GM-MØ-específicos o un descenso de los M-MØ-específicos similar al observado en macrófagos M-MØ humanos generados en presencia de CH-223191 (Fig. 26B). A pesar de ello, y en respuesta a LPS, los macrófagos M-MØ de ratones *Ahr* KO produjeron una mayor cantidad de TNF e IL-6 y una menor cantidad de IL-10 (Fig. 26C), lo que está en consonancia con datos publicados por otros grupos²²⁰.

La inhibición de AhR produce M-MØ con actividad inhibidora del crecimiento de células tumorales potenciada.

Además del cambio en la producción de citoquinas inflamatorias, observamos que los M-MØ generados

en presencia de CH-223191 exhiben una producción aumentada de activina A después de la estimulación con LPS (Fig. 25B). La expresión de activina A es característica de los macrófagos diferenciados en respuesta a GM-CSF (GM-MØ)¹⁰⁶ y, de acuerdo con su capacidad para suprimir el crecimiento de células cancerosas^{281,282}, confiere a los GM-MØ capacidad para limitar la proliferación de células tumorales¹⁰⁶. Por lo tanto, comparamos la proliferación de células tumorales en presencia de sobrenadantes de cultivo de M-MØ no tratados y tratados con CH-223191 (Fig. 27A). En comparación con los no tratados, el medio acondicionado procedente de M-MØ tratados con CH-223191 mostró una capacidad significativamente mayor para suprimir la proliferación de células de melanoma BLM (Fig. 27B)

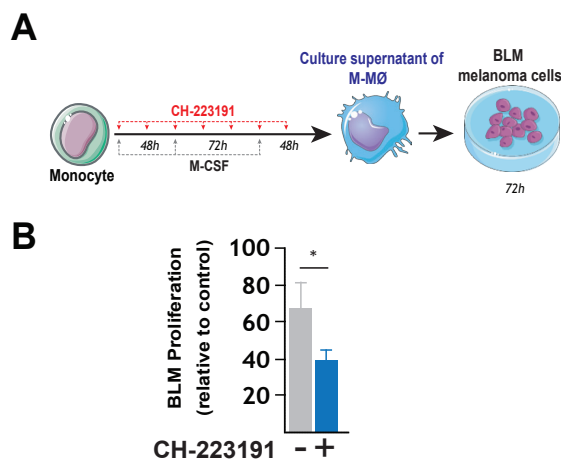


Figura 27. La inhibición de AhR produce M-MØ con actividad inhibidora del crecimiento de células tumorales mejorada. A. Modelo experimental. B. Capacidad relativa de inhibición del crecimiento de la línea celular de melanoma BLM por los sobrenadantes de M-MØ diferenciados en presencia (+) o ausencia (-) de CH-223191 (n = 6. ***, p < 0,001).

En consecuencia, concluimos que la inhibición de AhR durante la diferenciación de M-MØ inducida por M-CSF potencia la capacidad de reducir el crecimiento de células tumorales, una propiedad específicamente asociada a GM-MØ.

La inhibición de AhR produce M-MØ con metabolismo energético alterado.

Todos los resultados anteriores indican que, en comparación con sus controles no tratados, los M-MØ diferenciados con CH-223191 adquieren funciones transcripcionales, de producción de citoquinas y efectoras que son características de GM-MØ, mientras pierden algunas de las propiedades paradigmáticas de M-MØ anti-inflamatorios. Dado que el perfil bioenergético de GM-MØ y M-MØ es muy diferente, con mayor tasa de consumo de oxígeno, mayor glicólisis aeróbica y mayor expresión de genes que codifican enzimas glicolíticas en GM-MØ²⁸³, a continuación evaluamos si la inhibición crónica de AhR afecta al metabolismo energético en M-MØ (Fig. 28A).

A nivel transcripcional, M-MØ generados en presencia de CH-223191 expresaron niveles significativamente más altos de genes que codifican enzimas glicolíticas, incluyendo *PKM2*, *LDHA*, *SLC2A1* y *FBP1* (Fig. 28B). De acuerdo con este resultado, M-MØ generados en presencia de CH-223191 mostraron una mayor tasa de consumo de oxígeno (Fig. 28C) y de acidificación extracelular (ECAR) que los M-MØ control (Fig. 28D). En consonancia con este resultado, la concentración de lactato en el medio de los M-MØ generados en presencia de CH-223191 fué significativamente superior a la de sus homónimos M-MØ no tratados (Fig. 28E). Estos resultados indican que el bloqueo de la actividad AhR durante la diferenciación M-MØ cambia el perfil bioenergético de los macrófagos hacia un metabolismo glicolítico más robusto.

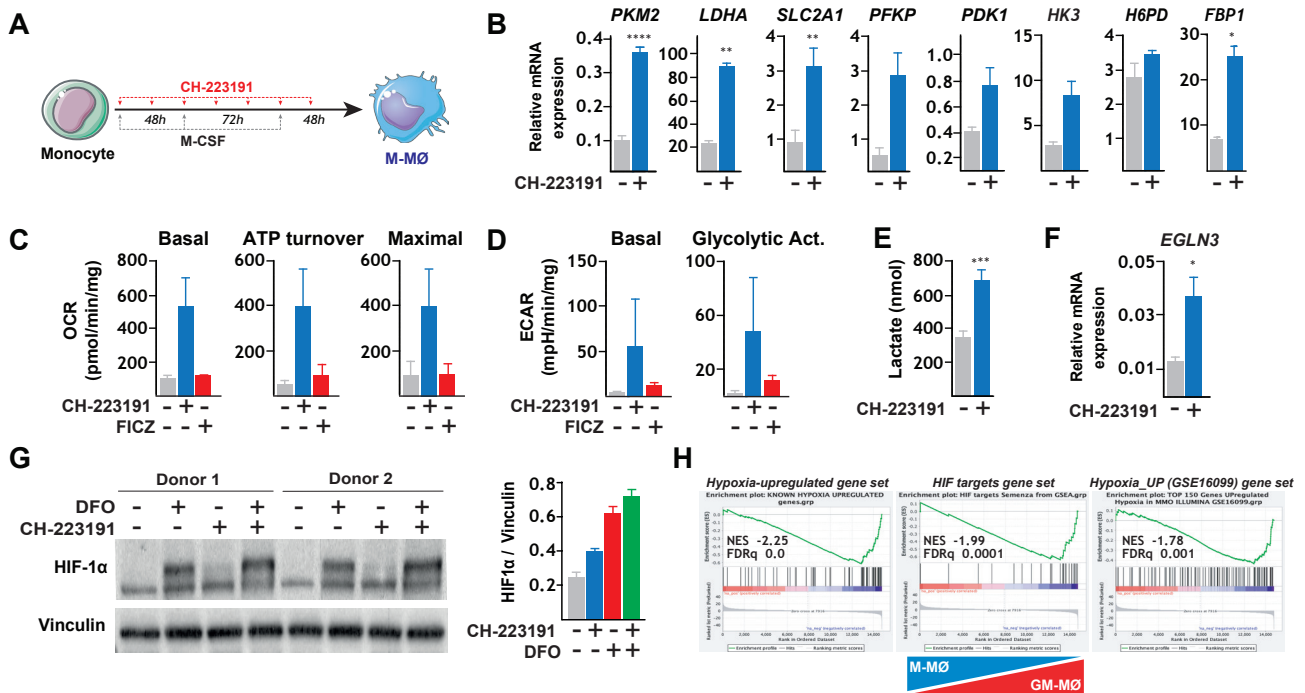


Figura 28. La inhibición crónica de AhR produce M-MØ con metabolismo energético alterado. **A.** Modelo experimental. **B.** Expresión relativa de los genes indicados en macrófagos M-MØ diferenciados en presencia de CH-223191 (+) o sus controles no tratados (-) (n = 4. *, p <0,05; **, p <0,01; ***, p <0,001). **C.** Niveles de OCR en macrófagos humanos M-MØ diferenciados en presencia de CH-223191 y FICZ determinados mediante el analizador de flujo de Seahorse Biosciencie XF. Las células se trataron secuencialmente con oligomicina 1 µM (Oligo), mas FCCP 0,4 µM y rotenona 1µM más antimicina A 1µM (Rot/AA). Se indican los parámetros metabólicos obtenidos del perfil de OCR después de restar la respiración insensible a rotenona/antimicina. El valor de “OCR basal” es la tasa de consumo de oxígeno en ausencia de efectores. El valor indicado como “ATP Turnover” se considera como la respiración sensible a oligomicina. El valor “Maximal” es el valor de OCR en presencia de la FCCP. Los resultados están normalizados con las concentraciones de proteína y se presentan como media de 2 muestras independientes. **D.** Niveles de ECAR en macrófagos humanos M-MØ diferenciados en presencia de CH-223191 y FICZ determinados mediante el analizador de flujo de Seahorse Biosciencie XF. El valor “Basal” indica la tasa de glucólisis en ausencia de efectores. “Glycolytic Activity” es el valor ECAR después de la inhibición de la síntesis mitocondrial de ATP con oligomicina. Los resultados están normalizados con las concentraciones de proteína y se presentan como media de 2 muestras independientes. **E.** Determinación de los niveles de lactato extracelular (nmoles) en los sobrenadantes de los M-MØ diferenciados en presencia o ausencia de CH-223191 (n = 6 , * **, p <0,001). **F.** Expresión relativa del gen *EGLN3* en M-MØ diferenciados en presencia de CH-223191 (+) o sus controles (-)(n= 4. *, p <0,05). **G.** Western Blot de los niveles de proteína HIF-1α en M-MØ diferenciados en presencia de CH-223191 o sus controles, y tratados o sin tratar con deferroxamína (DFO)(4h)(n=2). Representación gráfica de la densitometría del Western blot para HIF-1α, referida a los valores de Vinculina (panel derecho). **H.** GSEA de los transcriptomas de M-MØ y GM-MØ (referencias 106 y 278) utilizando los conjuntos de genes indicados extraídos de la bibliografía y disponibles en la página web de GSEA (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>).

Los resultados previos del grupo indican que la exposición de M-MØ a bajas tensiones de oxígeno (hipoxia) potencian su ECAR y la expresión de enzimas glicolíticas y genes GM-MØ-específicos a través de un mecanismo dependiente de HIF-1α²⁸³. Dada la semejanza de los efectos de la hipoxia y la exposición crónica a CH-223191, planteamos la hipótesis de que la inhibición de AhR podría causar efectos similares a la hipoxia. De hecho, la expresión del gen diana de HIF-1α *EGLN3* fue significativamente mayor en M-MØ expuestos a CH-223191 que en los controles no tratados (Fig. 28F). Además, y aunque en menor medida que la deferroxamina (DFO), la inhibición sostenida de AhR resultó en una mayor expresión de HIF-1α en M-MØ (Fig. 28G). Por lo tanto, la inhibición crónica de AhR provoca un cambio en el perfil bioenergético de M-MØ que parece correlacionarse con la adquisición de cambios transcripcionales y bioquímicos que tienen lugar en M-MØ expuestos a hipoxia.

Es importante destacar que, dado que los genes diana sensibles a la hipoxia y HIF-1α se enriquecen positivamente en el perfil transcripcional de GM-MØ (en comparación con M-MØ) (Fig. 28H), los cambios

metabólicos observados en M-MØ diferenciados con CH-223191 están en línea con la adquisición de características específicas de GM-MØ (transcripcional, perfil de citoquinas, inhibición del crecimiento tumoral), y avalan el efecto pro-inflamatorio de la inhibición de AhR durante la diferenciación de macrófagos promovida por M-CSF.

Los cambios transcripcionales propiciados por la inhibición crónica de AhR están mediados en parte por LXRα.

A diferencia de la inhibición crónica de AhR durante la diferenciación de M-MØ, la exposición de M-MØ completamente diferenciados a CH-223191 durante 6 horas no mostró un efecto transcripcional o funcional significativo (Fig. 22D). Por lo tanto, para determinar el período de tiempo necesario para observar los efectos de CH-223191 a lo largo de la diferenciación de M-MØ, los cambios transcripcionales causados por la inhibición de AhR se evaluaron cada 24 horas a lo largo de dicho proceso de diferenciación (Fig. 29A). Los cambios transcripcionales analizados fueron evidentes al final del proceso de diferenciación, no observándose en momentos anteriores (Fig. 29B). De manera similar, y a nivel de proteína, los niveles de MAF y MAFB se redujeron en M-MØ tratados con CH-223191 solo al final del proceso de diferenciación (Fig. 29C). Sin embargo, se observó una expresión elevada de LXRα (característica de M-MØ) durante la diferenciación en presencia de CH-223191 en puntos temporales anteriores (Fig. 29C), un hallazgo que correlaciona con la expresión aumentada de *NR1H3* tras 5 días de diferenciación con CH-223191 (Fig. 29B).

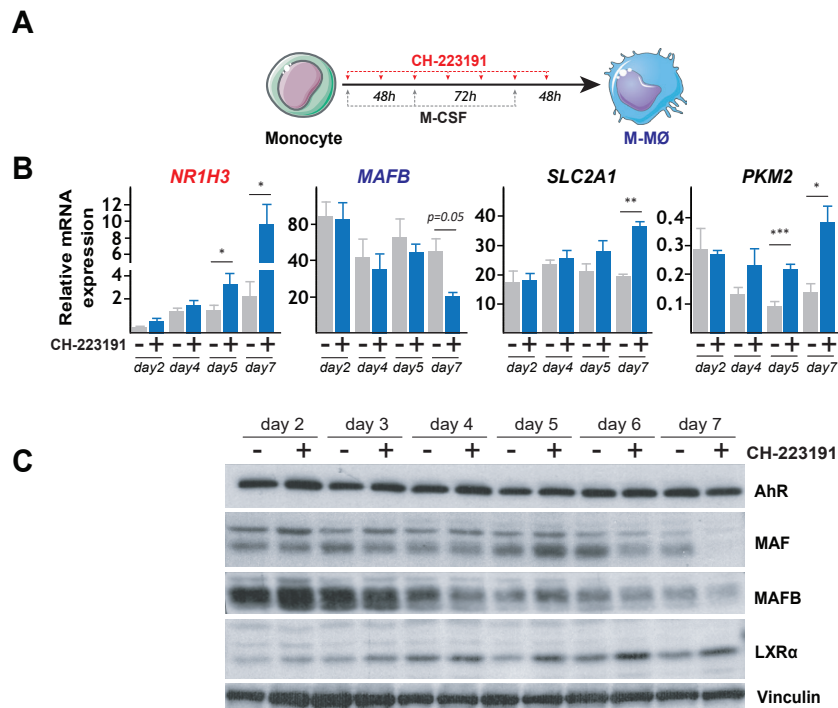


Figura 29. Análisis transcripcional y proteico de la cinética de diferenciación de macrófagos M-MØ en presencia de CH-223191. **A.** Representación gráfica del modelo usado en la cinética de diferenciación de monocitos a M-MØ en presencia de CH-223191. Se realizaron lisados a día 2, 4, 5 y 7 de la diferenciación. **B.** Expresión relativa de los genes indicados en M-MØ diferenciados en presencia de CH-223191 (+) o sus controles (-) durante 2, 4, 5 ó 7 días (n = 3. *, p <0,05; **, p <0,01; ***, p <0,001). **C.** Análisis por Western Blot de la expresión de las proteínas indicadas en M-MØ diferenciados en presencia de CH-223191 (+) o sus controles (-) durante 2, 4, 5 ó 7 días (n=1).

Para determinar si el aumento de la expresión de LXRα contribuye a los cambios transcripcionales y metabólicos inducidos por la inhibición crónica de AhR, los monocitos se expusieron al antagonista de LXRα GSK2033, antes de iniciar el proceso de diferenciación (Fig. 30A). Como se esperaba, el pretratamiento con GSK2033 abolió por completo la expresión del gen diana de LXRα *ABCA1* (Fig. 30B). Además, la inhibición de LXRα perjudicó el aumento en la expresión de *INHBA*, *MMP12* y *NR1H3* causada por la exposición continuada a CH-223191 (Fig. 30B), lo que sugiere la necesidad de LXRα para el efecto positivo que la inhibición crónica de AhR tiene sobre la expresión de marcadores específicos de GM-MØ.

Por el contrario, la inhibición de LXR α tuvo un efecto menor sobre la acción que CH-223191 ejerce sobre la adquisición de genes específicos de M-M \emptyset como *MAFB*, *FOLR2* o *IL10* (Fig. 30B). En la misma línea, la inhibición de LXR α no afectó el perfil bioenergético causado por la inhibición crónica de AhR, ya que la concentración de lactato fue similar en M-M \emptyset generados en ausencia o en presencia del inhibidor de LXR α (Fig. 30C).

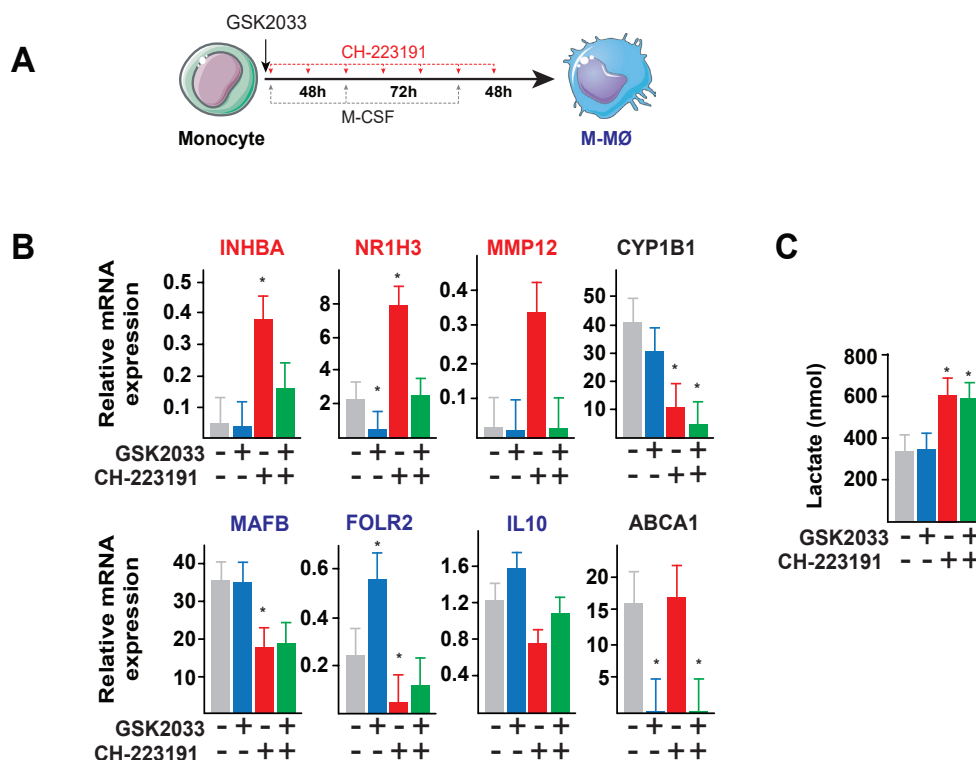


Figura 30. Los cambios transcripcionales propiciados por la inhibición crónica de AhR están mediados en parte por LXR α . **A.** Representación gráfica del modelo experimental. **B.** Expresión relativa de los genes indicados en M-M \emptyset tratados con GSK2033 (+) o sin tratar (-), y diferenciados en ausencia o en presencia del antagonista de AhR CH-223191. Indicados en rojo aparecen los genes asociados a GM-M \emptyset , extraídos del “Pro-inflammatory gene set”. En azul se indican los genes específicos de M-M \emptyset , extraídos del gene set “Anti-inflammatory gene set”. Los genes en negro, se corresponden con genes diana de AhR (*CYP1B1*) y LXR α (*ABCA1*). (n = 3. *, p < 0,05;). **C.** Determinación de la concentración de lactato extracelular (nmoles) en los sobrenadantes de los M-M \emptyset diferenciados en presencia o ausencia de GSK2033 y/o CH-223191 (n = 3. *, p < 0,05).

Por lo tanto, LXR α parece contribuir a la expresión mejorada de marcadores específicos de GM-M \emptyset en M-M \emptyset diferenciados en presencia de CH-223191, mediando en parte los cambios transcripcionales secundarios a la inhibición crónica de AhR.

Estudio del perfil transcriptómico en pacientes del síndrome Von Hippel Lindau.

Tras determinar la relación entre la inhibición crónica de AhR y el incremento en la expresión de genes diana y actividades dependientes de HIF-1 α , quisimos ahondar en el estudio de la relación entre ambos factores. Para ello, y con la colaboración de la Dra. Luisa Botella (CIB, CSIC), obtuvimos muestras de pacientes con síndrome de Von Hippel Lindau, caracterizados por la expresión en heterocigosis de la proteína VHL, crucial en la regulación de la estabilidad de HIF-1 α ²⁸⁴. En condiciones de normoxia VHL reconoce y marca HIF-1 α para su degradación por el proteosoma²⁸⁴, e hipotetizamos que los pacientes de dicho síndrome presentarían una mayor concentración de HIF-1 α a nivel proteico, al presentar una menor expresión de VHL²⁸⁵, lo que potenciaría el efecto de la inhibición de AhR.

Realizamos el aislamiento de monocitos y diferenciación de macrófagos procedente de sangre de pacientes con síndrome VHL y valoramos la expresión de genes afectados por la inhibición crónica de AhR²⁸⁴. Sin embargo, y como se muestra en la Figura 31, el análisis de dos pacientes de VHL no produjo los resultados hipotetizados. Aún así, es posible que los macrófagos de pacientes con síndrome VHL expresen suficiente VHL para degradar HIF-1 α en condiciones de normoxia.

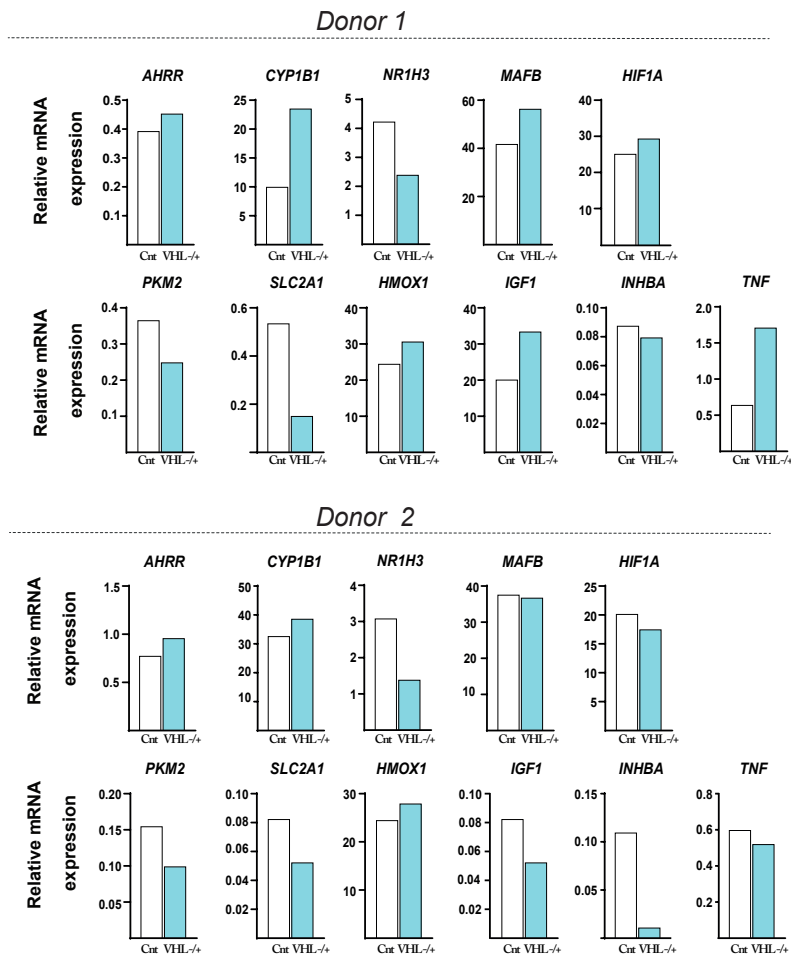


Figura 31. Análisis de la expresión génica en M-MØ derivados de monocitos de pacientes con el Síndrome de VHL. A. Determinación de la expresión relativa de los genes indicados en M-MØ generados a partir de los monocitos de dos pacientes con síndrome VHL (columna azul (VHL^{-/-}) y referida a su expresión en individuos control (columna blanca (Cnt)) (n=2).

DISCUSIÓN

Los macrófagos son las células más plásticas del sistema hematopoyético, encontrándose localizadas en todos los tejidos del cuerpo humano exhibiendo una alta diversidad funcional^{10,37,91,286,287}. Este tipo celular es capital en procesos como la regulación de la homeostasis, el desarrollo y la reparación de tejidos, encontrándose sus funciones estrechamente ligadas a su impronta ontogénica, al microambiente en el que se encuentran, y al reconocimiento de señales del mismo. La alta heterogeneidad funcional del macrófago le permite controlar el inicio y la resolución del proceso inflamatorio, donde una desregulación supondría la aparición de una serie de patologías relacionadas con estados de inflamación crónica. Entendiendo la importancia de esta célula en el sistema inmune, se antoja capital la comprensión de las bases moleculares que median en la polarización del macrófago. En nuestro afán por conocer más de la biología del macrófago, el presente trabajo de tesis ha sido enfocado al estudio del perfil transcripcional y funcional de macrófagos primados por M-CSF (M-MØ), y de la importancia de dos factores en dicho sistema; 5-HT_{2B} y AhR.

Hemos descrito el papel de 5-HT_{2B} en la detección y señalización de 5-HT en M-MØ, así como planteado la relación entre este receptor y el factor transcripcional AhR. Reportamos en primera instancia que la estimulación de macrófagos humanos con 5-HT provocaba un enriquecimiento en los set génicos mediados por AhR así como un incremento en la expresión de targets directos de este factor transcripcional. Dicha modulación génica era detenida al bloquear su señalización por 5-HT_{2B}, pero no por 5-HT₇. En línea con esto, determinamos que la activación de 5-HT_{2B} mediante el uso de agonistas sintéticos específicos para el mismo (BW723C86, 6APB, AMS) promovía la expresión de genes embebidos en el set génico controlado por AhR (*AHRR*, *CYP1B1*, *TIPARP*...) ²⁸⁸ ligando de esta manera, la estimulación por 5-HT y agonistas de 5-HT_{2B} con aplicaciones biológicas *in vivo* como es el BW723C86. La respuesta a LPS de estas células primadas con BW723C86 modulaba al alza la producción de quimioquinas de carácter anti-inflamatorio como CCL2²⁸⁹ y a la baja la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α), acompañado de un descenso en la expresión génica en línea con estos cambios (*CCL19*, *BMP6*, *ARNT2*...). De manera novedosa, hemos reportado cambios génicos controlados por BW723C86, cuyos efectos son independientes de su acción a través de 5-HT_{2B} y AhR como la modulación del proceso de diferenciación de osteoclastos.

Así mismo, hemos descrito el papel del factor transcripcional AhR en el proceso de polarización de macrófagos en presencia de M-CSF. Evaluamos como la función de dicho factor transcripcional es esencial para la adquisición del perfil de diferenciación de estas células en presencia de M-CSF. Reportamos que la inhibición de AhR va acompañada de una modulación génica (descenso de marcadores M-MØ; *MAFB*, *HTR2B*, *CSF1*... y aumento de marcadores GM-MØ; *INHBA*, *EGLN3*...) y funcional característica (incremento de lactato extracelular y perfil metabólico alterado) que producirá un “switch” hacia un perfil similar al de los GM-MØ. Además, determinamos que la inhibición de AhR modificaba la capacidad de estas células a responder ante estímulos como el LPS, caracterizándose por un incremento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , Activina A, IL-6) y un descenso en las de carácter anti-inflamatorio (IL-10). En línea con todo esto, valoramos la posible relación entre AhR y el factor inducible por hipoxia (HIF-1 α).

5-HT_{2B} y su papel en M-MØ.

En la actualidad sabemos que la 5-HT periférica funciona como un factor de crecimiento para las células progenitoras hematopoyéticas^{125,290}. La acción de esta molécula en la hematopoyesis apoya la existencia de “sistemas micro-serotonérgicos”, donde la producción local de 5-HT reemplaza la función hormonal de 5-HT derivada del intestino, además considerando que la 5-HT neuronal participa en el control de la ansiedad y el estrés, no es de extrañar que la 5-HT periférica también pueda funcionar como un sensor o adaptador de estrés²⁹¹ y en consecuencia, modular la respuesta inmune e inflamatoria.

Con todo ello, conocemos que 5-HT modifica una gran cantidad de funciones efectoras en los macrófagos, donde ejerce un efecto anti-inflamatorio^{249,255–259,291}. En línea con lo anteriormente descrito, se ha demostrado en el laboratorio que 5-HT inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos humanos principalmente a través de 5-HT₇¹⁵⁴, y desplaza el perfil transcripcional de M-MØ hacia el perfil anti-inflamatorio a través de 5-HT_{2B} y 5-HT₇^{109,154}. Podemos decir por tanto, que en M-MØ existe un doble efecto de 5-HT mediado por 5-HT_{2B} y 5-HT₇. A nivel de expresión génica, 5-HT reduce la expresión de genes

asociados a la adquisición del perfil pro-inflamatorio, como *INHBA*, *CCR2*, *MMP12*, *ALDH1A2*, *CD1B* y *SERPINE1*. Por otro lado potencia la expresión de genes asociados a la diferenciación anti-inflamatoria de macrófagos humanos impulsada por M-CSF (*SERPINB2*, *COL23A1*, *THBS1*, *STAB1*)^{109,154}.

Los efectos de 5-HT sobre 5-HT₇ implicarían la activación de PKA provocando la regulación positiva de los genes involucrados en quimiotaxis así como la regulación de la producción de citoquinas, la expresión aumentada de genes regulados positivamente por IL-10 y TGFβ1 y regulados negativamente por IFN de tipo I¹³⁷. En respuesta a LPS reportamos la inhibición de la liberación de IL-12p40, TNF y Activina A, así como la expresión de CXCL10 o IFNβ1, y un incremento en la expresión de TGFβ1. Con todo ello, 5-HT tiene un impacto considerable en el transcriptoma de macrófagos humanos y sus funciones efectoras, promoviendo la adquisición de un perfil funcional pro-fibrótico y anti-inflamatorio principalmente a través del eje 5-HT₇-PKA¹⁵⁴.

Los resultados derivados de esta tesis doctoral indican que la estimulación con 5-HT y su reconocimiento vía 5-HT_{2B}, activa la firma génica mediada por AhR, factor transcripcional esencial en otros tipos celulares como linfocitos T o células dendríticas^{247,292,293}. Otro modelo celular donde podemos encontrar la relación existente entre 5-HT y AhR es en células epiteliales intestinales. En este caso la presente activación de AhR es dependiente del transporte al interior celular de 5-HT a través de los canales SERT, independiente de receptores de serotonina²⁹⁴. Por otro lado, AhR y 5-HT_{2B}, intervienen en el desarrollo del sistema vascular, la polarización del sistema inmune y la resolución de las respuestas inflamatoria^{292,293}, reforzando la idea de una colaboración entre ambas moléculas^{109,154,175}.

En nuestras manos, la activación de 5-HT_{2B} con otros ligandos sintéticos específicos (BW723C86, AMS, 6APB) también promueve el enriquecimiento en la vía de AhR, detectándose incremento en la expresión de los target directos de este factor como son *CYP1B1* o *TIPARP*. El eje 5-HT_{2B}-AhR es también funcional en la línea celular de hepatoma HepG2 que expresa 5-HT_{2B}. Tomado en conjunto, nuestros resultados apuntan a que AhR y los genes controlados por dicho factor (*CYP1B1*, *AHRR*, *TIPARP*..) son efectores de la acción del receptor 5-HT_{2B} en macrófagos humanos.

Al pretender extrapolar los resultados obtenidos al modelo murino *Htr2b* KO, no hemos sido capaces de verificar la existencia del link 5-HT_{2B}-AhR. En este punto vale la pena mencionar que numerosos estudios han enfatizado las “dificultades de la extrapolación de ratón a humano”, ya que solo el 26% de los genes asociados a la polarización se conservan entre los macrófagos humanos derivados de monocitos y los macrófagos de ratón derivados de la médula ósea²⁸⁰.

Además de los cambios anteriormente descritos en M-MØ, el tratamiento con BW723C86 reduce la producción de TNFα y aumenta la liberación de la quimioquina anti-inflamatoria CCL2, ambos en respuesta a LPS. Coincidiendo con este efecto, en células dendríticas humanas CD1a⁺ derivadas de monocitos^{295,296}, la estimulación con BW723C86 previene su maduración e inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias¹⁶¹, TNFα, IL-12α, IL-6 o quimioquinas como CXCL10 o CXCL8 en respuesta a poliI:C. Estos datos sugieren un papel anti-inflamatorio de este receptor en células mieloides humanas.

En relación a la ruta de señalización de 5-HT_{2B}, el análisis de los datos de microarray de M-MØ tratados con BW723C86 utilizando la plataforma GSEA (análisis de enriquecimiento de set génicos) indicaba que existía un enriquecimiento de un grupo de genes relacionados con la ruta de señalización de las proteínas Gα12/13. La subfamilia Gα12/13 de proteínas G interacciona con receptores de serotonina tipo 2 (5-HT_{2A},_{2B} y _{2C}) y como molécula efectora utiliza la fosfolipasa A2 (PLA2)²⁹⁷. La interacción del ligando al receptor de serotonina provoca la activación de la proteína G asociada y conduce a la fosforilación y activación de la fosfolipasa A2 (PLA2), que junto con PLC son las moléculas efectoras en la señalización de 5-HT_{2B} dependiente de proteína G. Estos datos *in silico* sugieren que PLA2 podría intervenir en la señalización de 5-HT_{2B}, además la activación de PLA2 provoca la liberación de ácido araquidónico de la membrana, compuesto que se ha apuntado como ligando de AhR y que podría ser responsable de la activación de AhR en M-MØ tratados con BW723C86. En otros modelos celulares como hepatocitos se sabe que la señalización de 5-HT_{2B} promueve proliferación celular a través de la activación del PLC, y posterior activación de mTOR, PI3K,

ERK y PLA2¹⁵⁶. Experimentos preliminares incluidos en el presente trabajo, parecen indicar que la vía descrita 5-HT_{2B}-AhR podría señalar a través de PLC, PKC y Src, aunque se debe seguir explorando esta ruta de señalización, para esclarecer los mediadores en dicho proceso. La exploración del transcriptoma de M-MØ tratados con BW723C86 reveló que BW723C86 modifica la expresión de conjuntos de genes relacionados con enfermedades como; “Esclerosis lateral amiotrófica”, “Desarrollo de la válvula cardíaca” o “Regulación de la diferenciación de leucocitos mieloides”, casando estas marcas con la significación fisiopatológica de 5-HT_{2B} ya descrita^{109,119,161,175}.

Como hemos reportado, tanto BW723C86 como 5-HT_{2B} comparten la capacidad de alterar la adquisición de varios genes específicos de polarización durante la diferenciación de macrófagos (*SERPINB2*, *THBS1*, *ALDH1A2*, *STAB1*, *COL23A1*, *MMP12*, *CD1B*), es necesario señalar que existe una superposición baja entre los genes controlados por 5-HT_{2B} y los controlados por BW723C86, lo que sugiere que la participación de 5-HT_{2B} o 5-HT₇ en macrófagos humanos conduce a diferentes resultados transcripcionales, como los reportados en la activación de AhR por parte de 5-HT, dependiente de 5-HT_{2B} y no de 5-HT₇.

En línea con lo anteriormente comentado, la comparación de los transcriptomas de los macrófagos expuestos a BW723C86 donde se bloqueó la acción de 5-HT_{2B} previo tratamiento con un antagonista específico, evidenció que un porcentaje significativo de los cambios genéticos inducidos por BW723C86 no podía ser bloqueado por el antagonista 5-HT_{2B}, lo que sugiere que el BW723C86 también exhibe efectos independientes de 5-HT_{2B}. El análisis de ese conjunto génico independiente de 5-HT_{2B}, se relacionó directamente con el proceso de formación de osteoclastos. Encontramos en este conjunto génico desde genes conocidos como marcadores de osteoclastos a reguladores de la diferenciación de monocitos a osteoclastos^{276,299}.

Estos resultados abren una nueva vía de estudio interesante, en la que se deberá seguir trabajando con el objetivo de determinar la existencia de más acciones independientes de 5-HT_{2B} mediadas por el BW, además de esclarecer el mecanismo por el cual el BW723C86 lleva a cabo estos efectos en la diferenciación de osteoclastos. Estos resultados, permiten pensar que algunos de los efectos atribuidos al uso del BW *in vivo* pudieran ser también independientes de su señalización por 5-HT_{2B}, siendo necesario esclarecer este punto debido a su alta relevancia.

Posible papel de la vía 5-HT_{2B}-AhR en reparación y el desarrollo de tejidos como corazón y cerebro.

Dentro de las funciones más características de los macrófagos generados en presencia de M-CSF destaca su papel en la cicatrización de heridas³³⁸⁻³⁴⁰. Dentro de este proceso, las plaquetas (los principales transportadores de serotonina) son esenciales para el correcto taponamiento de la herida y su posterior coagulación. La liberación de 5-HT por las plaquetas, en respuesta a daño, generara cambios directos sobre los macrófagos tanto del tejido dañado, como en los macrófagos reclutados como respuesta al daño^{341,342}. Una vez producida la herida, y tras ocurrir la coagulación y posterior inflamación (donde distintos actores buscan la eliminación de patógenos) el proceso inflamatorio debe ser detenido para la recuperación de la homeostasis y la supervivencia del organismo. Tras esto, la serotonina plaquetaria (en línea con lo reportado en nuestros resultados) y la activación de 5-HT_{2B} podrían ser los encargados de actuar sobre los macrófagos de la zona afectada, generándose un claro sesgo en su polarización, reduciendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias (como TNF α) inhibiendo la capacidad de respuesta a LPS, y generándose un cambio en la polarización desde el perfil pro-inflamatorio propio de los macrófagos en contacto con patógenos en la herida, hacia el perfil necesario para el correcto cicatrizado, siendo este M-MØ anti-inflamatorio.

Como se ha comentado en la introducción, 5-HT_{2B} está estrechamente ligado al correcto funcionamiento del corazón y su acción es crítica en el desarrollo del mismo (los ratones *Htr2b*^{-/-} exhiben letalidad embrionaria y neonatal debido al aumento de la apoptosis acompañado por un descenso en el número de células en las trabéculas ventriculares)³⁴³⁻³⁴⁵. Sin embargo los mecanismos por los que esto ocurre no están completamente esclarecidos, siendo algunos de ellos, el incremento en la expresión de TGF β ^{346,347} y la señalización de 5-HT_{2B} por Src^{348,349}. De igual manera, en la bibliografía abundan las publicaciones que hacen referencia a una más que clara sinergia entre AhR y el correcto funcionamiento del corazón (los modelos murinos *Ahr*^{-/-} presentan hipertrofia cardíaca en edades tempranas además de procesos de fibrosis en este órgano)^{350,351}.

Atendiendo a nuestros resultados, podemos proponer por primera vez que la acción de BW723C86 (o 5-HT) a través de 5-HT_{2B} y la consecuente activación de AhR, establece una correlación directa entre ambos factores, siendo posible su colaboración para el correcto desarrollo cardiaco.

Además del corazón, encontramos en el cerebro otro de los tejidos donde AhR y 5-HT_{2B} podrían estar relacionados. El uso de los ratones *Htr2b*^{-/-} ha permitido caracterizar la importancia de este receptor en cerebro, concretamente en células de microglía, en las cuales la ausencia de *Htr2b* se asocia a un perfil más pro-inflamatorio y niveles elevados de genes inflamatorios directamente relacionados con la quimiotaxis (*Ccr2, Ccr3, Ccr5, Cxcr5*)¹⁵⁸. En línea con esto, es conocido el papel de AhR en neurogénesis, donde la correcta señalización de este factor después de una lesión cerebral es necesaria para restaurar la neurogénesis, tras el control de la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que la inhibición de AhR poco después de una lesión cerebral bloquea la generación de endimoglia (un tipo de célula glial encargada de la reparación del tejido) mientras que los altos niveles de AhR logrados 7 días después del daño promueven la generación de endimoglia³⁵¹ y por tanto la resolución del daño.

AhR como factor esencial en macrófagos humanos M-MØ anti-inflamatorios.

Para la supervivencia celular y el correcto mantenimiento de la homeostasis, resulta vital la adaptación y respuesta a los cambios moleculares del microentorno, producidos por la dieta, el medio ambiente, la flora comensal o el metabolismo del huésped^{4,8,12}. Las células cuentan con múltiples sensores para detectar estas alteraciones, siendo uno de estos el receptor de Aril hidrocarburos (AhR)²⁹⁹.

AhR como (se indicó en la introducción de esta tesis), es miembro de la superfamilia de factores de transcripción PER-ARNT-SIM (PAS)³⁰⁰. Las proteínas pertenecientes a esta familia presentan un dominio característico PAS encargado de la detección de factores tanto endógenos (tales como tensión de oxígeno o potencial redox) como factores exógenos (hidrocarburos poli-aromáticos y toxinas). Al igual que AhR reconoce factores exógenos otros miembros de la superfamilia PAS participan en la detección de señales como; niveles de oxígeno (HIF-1 α)^{301,302}, potencial redox o cambios en el ritmo circadiano³⁰³, controlando así la adaptación al entorno celular.

La caracterización estructural y funcional de AhR ha permitido reconocer la capacidad de este factor para modular multitud de procesos biológicos que son altamente relevantes para la homeostasis de los tejidos, así como también, para el desarrollo de afecciones patológicas. Es por tanto probable que el estudio de la regulación y función de AhR revele procesos biológicos desconocidos y pueda guiar al desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas^{300,304}.

Considerando el papel anti-inflamatorio de AhR en macrófagos, se valoró si la firma génica, que define la activación de AhR podría estar diferencialmente expresada en M-MØ y GM-MØ. El análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA) de los perfiles de genes de ambos subtipos de macrófagos reveló que el perfil génico M-MØ exhibe una sobrerrepresentación significativa de los genes diana del factor transcripcional AhR previamente identificados en macrófagos humanos expuestos al benzo(a)pireno²⁵¹ y en células dendríticas humanas expuestas a VAF347 (GSE10463)²⁵² (Fig. 22A). A la par, se reportó una sobrerrepresentación significativa de genes regulados negativamente tras la activación de AhR en el transcriptoma de GM-MØ (Fig. 22B). En conjunto, estos resultados demostraron la expresión diferencial de genes diana de AhR en M-MØ y GM-MØ, sugiriendo una activación preferencial de AhR en los M-MØ anti-inflamatorios derivados de monocitos humanos. Por ello, decidimos interpretar la relevancia de este factor transcripcional en la biología de los macrófagos anti-inflamatorios.

La inhibición de AhR mediante el uso del antagonista CH-223191²⁷⁹, reflejo un descenso en marcadores característicos de M-MØ, entre ellos *HTR2B* y *MAFB*, factor clave para esta diferenciación¹⁰⁷. Al validar estos resultados por Western Blot, determinamos un descenso muy significativo en MAF (*C-Maf*)³⁰⁵ (molécula importante en este sistema de diferenciación y estrechamente relacionada con la expresión de *IL-10*). Este descenso en *C-Maf* podría explicarse al ser un cofactor del propio AhR, como ya se ha reportado en otros modelos, como las células Th17³⁰⁶. La relación entre ambos cofactores está todavía por esclarecer, tomando

importancia nuestros resultados ya que indicarían el papel de AhR como regulador directo sobre la expresión de *C-Maf*. Además la inhibición de AhR ligado a la falta de *C-Maf* en nuestras células casaría con la peor capacidad de estas en la producción de IL-10, citoquina directamente regulada por ambos factores³⁰⁶.

Por otro lado la diferenciación de M-MØ en presencia de CH-223191 modifica el perfil transcriptómico de los macrófagos, reduciendo la expresión de marcadores genéticos que definen esta población celular entre los que podemos citar:

IGF1 (Factor de crecimiento similar a la insulina), molécula que se encuentra directamente ligada con la diferenciación de M-MØ, cuyo eje de señalización es necesario para el mantenimiento de este fenotipo³⁰⁷. Es conocida, la regulación positiva entre AhR y la síntesis del receptor de IGF1. Todo esto hace de IGF1 una molécula de carácter anti-inflamatorio y su pérdida favorece que nuestros macrófagos tiendan a la adquisición de un perfil similar al presentado por macrófagos pro-inflamatorios GM-MØ.

FOLR2, también sufre un descenso claro en su expresión al bloquearse la acción de AhR. El receptor de folato es una molécula diferencialmente expresada en el fenotipo M-MØ en comparación con GM-MØ, haciendo de ella uno de los mejores marcadores para esta población de macrófagos anti-inflamatorios³⁰⁸.

La proteína conocida como CD209 o DC-SIGN en macrófagos reconoce y se une a carbohidratos tipo manosa, marcador molecular que se encuentra en la superficie de virus, bacterias y hongos. La interacción con el receptor activa fagocitosis en macrófagos proceso que está estrechamente vinculado a macrófagos anti-inflamatorios. En nuestro laboratorio se reportó que el M-CSF impulsa la expresión de DC-SIGN durante la diferenciación de macrófagos, haciendo de esta molécula un magnífico marcador de polarización M-MØ³⁰⁹.

Además de la pérdida de marcadores característicos de M-MØ la diferenciación en presencia de CH-223191 estimula la adquisición de marcadores propios de GM-MØ. En concreto, la adquisición de *INHBA*, molécula que define a la población de macrófagos pro-inflamatorios¹⁰⁶ al igual que *CLEC5A* o *HSD11B11*.

Mención especial recibe la regulación de *NR1H3* ($LXR\alpha$) por parte de AhR en nuestras muestras. La inhibición de AhR incrementa de manera significativa la expresión y traducción de $LXR\alpha$. Los LXR regulan el flujo de salida de colesterol de macrófagos, no solo al inducir proteínas transportadoras de colesterol (*ABCA1* y *ABCG1*) sino también a través de una mayor producción de aceptores de colesterol (apoE y apoC) y proteínas de remodelación de lipoproteínas (*PLTP* y *LPL*) así como favorecen la eliminación de colesterol mediante la inducción de la expresión de E3 ubiquitin ligasas como *Idol*³¹⁰. En la bibliografía existe relación descrita entre este receptor y AhR en el modelo de diferenciación de células Th17. La expresión y activación de $LXR\alpha$ inhibe la diferenciación de células Th17 mediante la inducción en la expresión de la molécula *Srebp-1*, la cual se une al sitio PAS de AhR e inhibe su acción como factor transcripcional impidiendo la adquisición del perfil Th17³¹¹.

$LXR\alpha$ ha sido descrito como un regulador negativo del proceso inflamatorio^{312,311}, aunque también se conoce en otros modelos su posible rol en el contexto pro-inflamatorio³¹⁴. Los últimos resultados que incluimos en el presente trabajo parecen indicar que las acciones directas de la inhibición crónica de AhR durante la diferenciación de M-MØ, son en parte dependientes de la acción de $LXR\alpha$. Concretamente reportamos que $LXR\alpha$ media en la adquisición de marcadores propios de GM-MØ mientras que no juega papel alguno en la adquisición de marcadores típicos de M-MØ, así como en el perfil metabólico de estas células. Es necesario investigar la relación de AhR con $LXR\alpha$, así como el papel del propio $LXR\alpha$ en la diferenciación de macrófagos humanos.

Nuestros resultados fijan el papel de AhR como regulador negativo del proceso inflamatorio mediante la inhibición de la adquisición de marcadores de carácter inflamatorio, así como la emisión de citoquinas de este espectro. En consonancia con esto, se sabe que en células dendríticas la activación de AhR con ligandos como el TCDD bloquea las capacidades inflamatorias de estas células así como su respuesta a LPS²⁴⁰.

El bloqueo de la función de AhR en nuestros macrófagos no solo refleja una modificación transcripcional

y traduccional, sino que además desemboca en células funcionalmente afectadas. Dentro del conjunto de funciones que caracteriza a los macrófagos GM-MØ y M-MØ encontramos en la respuesta a LPS una de las principales diferencias. La respuesta de nuestros macrófagos primados con M-CSF es de carácter anti-inflamatorio secretando citoquinas como IL-10, en comparación con los GM-MØ cuya respuesta es de carácter pro-inflamatorio, caracterizándose por la producción de INHBA, TNF α o IL-6. La inhibición de AhR provoca un cambio en el perfil de producción de citoquinas cayendo la producción de IL-10 y aumentando la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 o Activina A así como el TNF α ^{10,295}.

En línea con estos descubrimientos, conocemos el papel de AhR como regulador de la producción de IL-10^{220,315} así como de la síntesis de IL-6 al poseer dicho factor transcripcional en estos promotores génicos secuencias de reconocimiento. De igual manera sabemos que AhR es un regulador de la síntesis de TNF α , aunque no está tan claro si de carácter positivo o negativo^{316,317}. AhR no solo puede regular la producción de citoquinas actuando sobre sus promotores, sino que también es capaz de regular la respuesta inflamatoria al interactuar con P65 y/o p50 subunidades del complejo de NF κ B, esencial en dicha respuesta³¹⁸⁻³²¹. En nuestro caso podemos decir que la inhibición de AhR favorece la adquisición de un perfil similar al de macrófagos GM-MØ, donde priman la producción de citoquinas pro-inflamatorias en detrimento de las anti-inflamatorias.

En nuestra pretensión de extrapolar los resultados obtenidos en humano al modelo murino confirmamos el papel de AhR (ya descrito) en el control de la respuesta inflamatoria de estos macrófagos en respuesta a LPS³¹⁵. Cuando analizamos el transcriptoma de los macrófagos extraídos de ratones *Ahr* KO, no fuimos capaces de reportar modificaciones en los genes escogidos como marcadores de diferenciación de macrófagos GM-MØ y M-MØ, enfatizando de nuevo la dificultad de extrapolación de ratón a humano con respecto a los marcadores de polarización de macrófagos humanos³²².

En los macrófagos GM-MØ la glicólisis anaeróbica se induce tras la activación, lo que implica un aumento en la absorción de glucosa así como la conversión de piruvato en lactato. Al mismo tiempo, las actividades de la cadena respiratoria se atenúan lo que permite la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, la vía de la pentosa fosfato también se induce. Esta vía es clave para la generación de NADPH para la NADPH oxidasa, que es importante para la producción de ROS, pero también para la síntesis de óxido nítrico^{323,324}. En conjunto, estos eventos metabólicos pueden proporcionar a la célula energía rápida y equivalentes reductores, que son necesarios para la actividad bactericida. Los macrófagos M-MØ, por otro lado, obtienen gran parte de su energía de la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo oxidativo, que puede mantenerse por más tiempo. Después de la activación, pueden inducir la expresión de constituyentes de la cadena de transporte de electrones que realizarán la fosforilación oxidativa, además de conducir el piruvato al ciclo de Krebs. La vía de la pentosa fosfato también es más limitada en los macrófagos M-MØ. El bloqueo del metabolismo oxidativo no solo bloquea el fenotipo M-MØ sino que también lleva al macrófago a un estado GM-MØ. Del mismo modo, forzar el metabolismo oxidativo en un macrófago GM-MØ potencia el fenotipo M-MØ^{283,284,325}.

Explorando la posibilidad de que la inhibición de AhR provocara una modificación a nivel metabólico en estas células realizamos ensayos de medición de lactato extracelular, subproducto metabólico que indica un proceso glicolítico exacerbado en nuestros macrófagos tratados con CH-223191. En línea con esto, la valoración de la expresión de genes englobados dentro de la vía glicolítica en nuestras células tratadas reportó un incremento significativo de la expresión de LDHA, enzima esencial para la producción de lactato³²⁶. De igual manera, reportamos un incremento en la expresión de *PKM2* (encargada de la síntesis de piruvato y generación de ATP), de *GLUT1* (transportador de glucosa encargado de la internalización de dicho azúcar, sobrepresado en GM-MØ) y *FBP1*^{327,328}. *PKM2* es una enzima clave en la glucólisis siendo su incremento asociado directamente con un enriquecimiento en esta vía. *PKM2* es capaz de transactivar la expresión de SLC2A1, LDHA, PDK1, HK1 y VEGFA a través del factor de transcripción HIF1- α . Además, *PKM2* es capaz de promover el crecimiento celular y proliferación mediante su acción sobre factores como HIF-1 α , β -catenina (β -cat), insulina o STAT3³²⁹⁻³³².

En línea con lo anteriores cambios, reportamos un incremento significativo en la expresión de *EGLN3* (PHD3), gen cuya expresión es directamente controlado por HIF-1 α ³³³.

Toda esta firma génica y funcional alterada en cuanto al metabolismo se refiere, indicaba un posible papel de HIF-1 α en este proceso de diferenciación donde se inhibió AhR. La relación entre ambos factores transcripcionales es apoyada por la bibliografía³³⁴⁻³³⁶ no siendo tan claro el posible efecto de uno sobre otro.

Ejemplo de esta disonancia encontramos la acción de ambos sobre la diferenciación de células T. AhR es capaz de modular la diferenciación de células T, donde la activación de dicho factor transcripcional dicta la diferenciación hacia el perfil Th17 y su inhibición hacia el perfil Treg. En este modelo de diferenciación HIF-1 α juega un papel similar favoreciendo la diferenciación hacia el perfil Th17 mediante la inhibición de FOXp3^{278,293}. Sin embargo, existen reportes donde se sostiene que la activación de AhR lidera la degradación proteosomal de HIF-1 α , y que además de esto, la expresión de HIF-1 α provocaría una desaparición de AhR, proponiéndose un sistema bidireccional donde la expresión de uno regula la presencia del otro^{210,337}. Es posible que en nuestros macrófagos M-M \emptyset esté ocurriendo un “diálogo” entre ambos factores. La expresión de AhR en el subtipo de macrófagos M-M \emptyset es más alta que en macrófagos GM-M \emptyset , y a la inversa ocurre con la firma génica mediada por HIF-1 α . En resumen, nuestros resultados indican una relación entre AhR y HIF-1 α en el modelo de diferenciación de macrófagos humanos M-M \emptyset *in vitro*.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de AhR en la diferenciación de monocitos a macrófago M-M \emptyset y la necesidad de este factor transcripcional para el correcto funcionamiento de los mismos.

AVANCES

Partiendo de investigaciones previas del laboratorio, la presente Tesis Doctoral ha diseccionado el efecto de la serotonina en macrófagos humanos. Más concretamente, el estudio presentado ha permitido demostrar que la firma génica de macrófagos anti-inflamatorios (M-MØ) está condicionada por serotonina a través de su interacción con el receptor 5-HT_{2B} y de la actividad del factor transcripcional AhR. Estos resultados nos han permitido establecer por primera vez la existencia de una relación directa entre 5-HT_{2B} y AhR en macrófagos humanos. Por otra parte, los experimentos llevados a cabo con agonistas del receptor 5-HT_{2B} BW723C86 han permitido también evidenciar efectos de dicho agonista que son independientes de su interacción con 5-HT_{2B}, siendo especialmente destacable su capacidad de bloquear la diferenciación de osteoclastos in vitro.

De manera adicional, el estudio incluido en la presente tesis Doctoral ha puesto de manifiesto el papel relevante del factor de transcripción AhR en la generación de macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de M-CSF. De forma específica, el empleo del antagonista CH-223191 durante dicha diferenciación nos ha permitido demostrar que la inhibición de AhR conlleva la disminución de la adquisición de genes específicos de macrófagos anti-inflamatorios, la alteración del perfil de citoquinas característico de éstos macrófagos, y un cambio considerable en su perfil bioenergético.

PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. Concha Nieto*, Ignacio Rayo*, Mateo de las Casas-Engel, Elena Izquierdo, Bárbara Alonso, Catherine Béchade, Luc Maroteaux, Miguel A. Vega and Ángel L. Corbí. ***Serotonin (5-HT) shapes the macrophage gene profile through the 5-HT_{2B}-dependent activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)***. Journal of Immunology, accepted with minor revision. (*, equal contribution)
2. Concha Nieto, Ignacio Rayo and Ángel L. Corbí. ***5-HT_{2B} on Macrophages: what for? In "5-HT_{2B} receptors: from molecular biology to clinical applications"*** by Springer Science, New York. Book series The Receptors. Luc Maroteaux, Laurent Monassier, and Giuseppe Di Giovanni, Series Editors. En revisión, 2020.

Es necesario destacar que en esta tesis se han incluido experimentos realizados por la Dra. Concepción Nieto Mazarrón. Dichos experimentos se encuentran ilustrados en las figuras 13-19 y 21.

CONCLUSIONES

- I. La serotonina modula la firma génica de M-MØ a través de su interacción con 5-HT_{2B} y la modificación de la actividad de AhR.
- II. El agonista BW723C86 modula la firma transcripcional de macrófagos humanos M-MØ parcialmente a través de 5-HT_{2B}.
- III. BW723C86 modifica la producción de citoquinas y el perfil génico de M-MØ activados por LPS.
- IV. BW723C86 aumenta la expresión de genes diana de AhR a través de 5-HT_{2B}.
- V. AhR media el aumento en la expresión de genes diana de AhR inducido por BW723C86 en macrófagos humanos y células HepG2.
- VI. La estimulación con BW723C86 provoca cambios génicos independientes de su acción sobre 5-HT_{2B}, y bloquea la diferenciación de osteoclastos in vitro.
- VII. AhR se expresa durante la diferenciación de macrófagos humanos in vitro, y la expresión de sus genes diana es significativamente mayor en macrófagos diferenciados en presencia de M-CSF
- VIII. La inhibición de AhR con el antagonista CH-223191 durante la diferenciación de macrófagos M-MØ disminuye la adquisición de genes M-MØ-específicos y aumenta la expresión de marcadores de macrófagos GM-MØ.
- IX. La inhibición de AhR durante la diferenciación de macrófagos M-MØ aumenta la expresión citoquinas inflamatorias (TNF, IL6, Activina A) y reduce la producción de IL-10 en respuesta a LPS.
- X. La inhibición de AhR durante la diferenciación de macrófagos M-MØ potencia la adquisición de la capacidad de limitar el crecimiento de células tumorales in vitro.
- XI. La inhibición de AhR durante la diferenciación de macrófagos M-MØ causa un incremento en la expresión de enzimas de la vía glicolítica (PKM2, LDHA, GLUT6, FBP1), un incremento en la producción de lactato extracelular, y genera un perfil bioenergético similar al de macrófagos diferenciados con GM-CSF.
- XII. La inhibición de AhR durante la diferenciación de M-MØ aumenta la expresión de genes HIF1A-dependientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generación de Macrófagos humanos derivados de monocitos y cultivo celular.

Se utilizaron buffy-coats de pacientes sanos para la extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante gradientes de densidad realizados con Lymphoprep (Nycomed Pharma). Posteriormente, los monocitos fueron purificados de los PBMC empleando bolas magnéticas anti-CD14 (Miltenyi Biotec) (>95% células CD14⁺). Los monocitos obtenidos se cultivaron ($0,5 \times 10^6$ células/ml) en placas de 12 pocillos (Costar) durante 7 días en medio RPMI 1640, (Gibco Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada con 21% O² and 5% CO². La diferenciación de monocito a macrófagos se realizó en presencia de GM-CSF (1.000 U/ml, Immunotools) o en presencia de M-CSF (10 ng/ml, Immunotools) para generar macrófagos pro-inflamatorios (GM-MØ) o anti-inflamatorios (M-MØ), respectivamente. Las citoquinas se añadieron al cultivo cada dos días.

Para la activación de macrófagos, las células fueron expuestas a LPS de *Escherichia coli* 055:B5 (10 ng/ml) durante 18 h. Los agonistas del receptor 5-HT_{2B} BW723C86 (α -metil-5-(2-thienilmetoxi)-1H-indol-3-etanamina) y alfa-metilserotonina (AMS), así como el antagonista de 5-HT_{2B}, SB204741, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. El agonista del receptor 5-HT_{2B} 6-APB (6-(2-aminopropil) benzofurano) fue obtenido de Cayman. El agonista de AhR FICZ (Enzo) y el antagonista CH-223191 (Calbiochem) fueron usados a 250 nM y 3 μ M, respectivamente. En los ensayos de diferenciación de monocitos en presencia de M-CSF, el CH-223191 fue usado a 3 μ M, añadiéndose todos los días. El inhibidor de LXR α GSK2033 (Tocris) se empleó a 1 μ M.

Para el análisis de la ruta de señalización de 5-HT_{2B} se emplearon inhibidores de PLC (U-71322, 10 μ M), PKC (GO-6976, 1 μ M), y G/q11 (D-TRP-Substance, 1 μ M) (Tocris). Para la inhibición de Src y Raf se emplearon Saracatinib (10 μ M) (Selleckchem) y Vemurafenib (10 μ M) (Selleckchem), ambos cedidos por el Dr. Joaquín Texeido (Centro de investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid).

Generación de osteoclastos derivados de monocitos.

Los osteoclastos derivados de monocitos humanos fueron generados mediante el cultivo de monocitos de 9 a 12 días sobre cubreobjetos de vidrio en presencia de M-CSF (25 ng/ml) y RANKL (30 ng/ml), añadidas al cultivo cada 72 horas. Para su tinción y visualización al microscopio, se usó el kit Leukocyte Acid Phosphatase (Sigma Aldrich) de tinción para la fosfatasa acida resistente a tartrato (TRAP).

Modelos animales.

En la presente tesis se empleó la cepa *Htr2b* KO341, proporcionada por el Dr. Luc Maroteaux (INSERM, Institut du Fer à Moulin, Paris) y la cepa *Ahr* KO342, proporcionada por la Dra. María A. Moro (Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España). El ratón *Htr2b* *-/-* fue generada en un fondo genético 129S2/SvPas (129S2), mientras que para el ratón *Ahr* KO se usó un fondo genético C57Bl/6. La edad de los ratones machos utilizados en los ensayos osciló entre 8 y 12 semanas. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y se realizaron de acuerdo con las directrices aprobadas.

Preparación de macrófagos derivados de médula ósea.

Los macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) cultivados en presencia de M-CSF se generaron empleando un protocolo previamente descrito⁶¹. En resumen, las células de médula ósea se aislaron de los fémures de ratones y se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10% FBS. Tras esto, las células no adherentes se recogieron y cultivaron en presencia de M-CSF (10 ng/ml, Immunotools). Tras 7 días, las células se recogieron para su análisis.

Medición de la respiración celular y la acidificación extracelular (Perfil Bioenergético).

Para la determinación del perfil bioenergético celular se usó el analizador de flujo XF24 (Seahorse Biosciences). Se sembraron las células (250.000 células/pocillo) en placas de XF24 (Seahorse Biosciences) permitiéndose su recuperación durante 24h. A continuación se incubaron las células en medio DMEM libre de bicarbonato (Sigma-Aldrich) suplementado con 11,11 mM de glucosa, 2 mM de L-glutamina, 1 mM piruvato, y 2% de FBS (Sigma-Aldrich) en un incubador libre de CO² durante 1 h. Para la determinación de la actividad mitocondrial y la actividad glicolítica, se obtuvieron los valores del “ratio” de consumo de oxígeno (OCR) y el “ratio” de acidificación extracelular (ECAR), respectivamente. Tras cuatro mediciones en condiciones basales, las células se expusieron secuencialmente a 1 mM oligomicina, 0,6 mM Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), 0,4 mM FCCP, y 0,5 mM rotenona más 0,5 mM Antimicina A (Sigma-Aldrich). Se realizaron tres mediciones consecutivas en cada una de las condiciones mencionadas, siendo estas mediciones promediadas posteriormente. El valor de respiración mitocondrial (Valor de OCR tras la adición de la Rotenona y Antimicina A) fue restado de todas las mediciones de OCR. La fluctuación de ATP o “ATP turnover” fue estimado de la diferencia entre la respiración basal y la respiración inhibida en presencia de oligomicina. Además, la capacidad máxima respiratoria se obtuvo considerando los valores obtenidos en presencia de FCCP. Se realizaron 5 réplicas de cada análisis, y los resultados se normalizaron con la cantidad de proteína de cada ensayo.

Ensayos de proliferación celular.

Las células BLM (células de melanoma humano) se sembraron en placas (5 x 10³ células /pocillo), se dejaron adherir durante 24 h, y se expusieron a sobrenadantes de cultivo de macrófagos humanos diferenciados en presencia o ausencia de CH-223191 durante 48 h. La proliferación celular se evaluó utilizando MTT (Sigma-Aldrich). Se usaron medios completos como control para determinar la proliferación celular basal.

Western blot.

Los lisados celulares son obtenidos en diferentes búferes; Buffer RIPA (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM Pefabloc, 2 mg/ml aprotinina/antipaina/leupeptina/pepsatina, 10 mM NaF, y 1 mM Na₃VO₄), SDS 5% o buffer RIPA modificado para la detección de HIF-1 α (con Lactacistina 10 μ M) además de los inhibidores anteriormente citados para el buffer RIPA convencional. Entre 10 y 50 μ g de los lisados fueron sometidos a SDS-PAGE y posteriormente transferidos a membrana de PVDF (Millipore). La detección de proteínas se dio mediante la utilización de los anticuerpos contra MAFB (sc-10022, Santa Cruz, CA, USA), AhR (sc-133088, Santa Cruz, CA, USA), DC209 (sc-11038, Santa Cruz, CA, USA), LXR- α (PPZ0412, RD System, Mineápolis, USA), MAF (sc-7866, Santa Cruz, CA, USA), HIF-1 α (Clone 54/HIF-1 α (RUO), BD biosciencie, New Jersey, U.S) .Las muestras para la detección de CLEC5A (MAB2384, R&D Systems, MN, USA) se prepararon bajo condiciones no reductoras. La carga de proteína fue normalizada mediante el uso de anticuerpos contra GAPDH (sc-32233, Santa Cruz, CA, USA) Vinculina (094M4817V, Sigma Aldrich, Missouri, USA) y β -Actina (AC-14, Sigma Aldrich, Missouri, USA).

ELISAS.

Se realizó la medición de citoquinas en los sobrenadantes de los macrófagos mediante el uso de kits de ELISA comerciales para TNF α , IL12p40, CCL2 (BD Biosciences, CA, EEUU), IL-6 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), CCL19 (PBL Assay Science, NJ, EEUU), Activina A (Human/Mouse/Rat Activin A Quantikine ELISA, R&D System) e IL-10 (Biolegend, CA, EEUU) de acuerdo a los protocolos facilitados por las casas comerciales.

Kit colorimétrico medición de Lactato extracelular.

El sobrenadante de los macrófagos tratados con CH-223191 fue alicuotado y analizado sus niveles de lactato mediante el kit “*Lacatate Colorimetric Assay Kit IP*” (Bio visión, K627-100).

Transfección y ensayos de genes reporteros.

Para los ensayos de transfección de genes “reporter” se usó Cignal Xenobiotic Response Element (XRE-Luc),

donde la construcción XRE-Luc contiene repeticiones en tándem de la secuencia de reconocimiento de AhR (XRE). Para normalizar la eficiencia de transfección se empleó una construcción en la que el gen de la luciferasa de Renilla se encuentra bajo el control de un promotor constitutivo. Las células HepG2 (80.000 células/pocillo), o los macrófagos M-MØ (1x10⁶ células/pocillo), fueron transfectados con 1 µg de DNA de la mezcla XRE-Luc utilizando Superfect (Qiagen) o VIROMER RED (Lipocalix), respectivamente. Después de la transfección, las células se cultivaron 12-18 horas, y fueron expuestas a BW723C86 (10 µM), FICZ (250 nM), CH-223191 (3 µM) o DMSO durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, las células se lisaron y las actividades de luciferasa de Renilla y “firefly” se cuantificaron usando el Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega).

Transfección con Ácidos Ribonucleicos de interferencia: Silenciamiento de RNA (siRNA).

Macrófagos M-MØ (1x10⁶ células) fueron transfectados con siRNA específicos para AhR (siAhR, 50 nM) (#s1199, Thermo-Fisher Scientific) utilizando HiPerFect (Qiagen). Como control de transfección se usó un siRNA inespecífico (SiC) (#4390843, Thermo-Fisher Scientific). Las células se recuperaron de la transfección en medio completo y fueron tratadas durante 6h con BW723C86 (10 µM) antes de su análisis.

Retrotranscripción y PCR cuantitativa: qRT-PCR.

El aislamiento del RNA total se llevó a cabo con el kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel). El RNA fue retrotranscrito utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit, (AB). Los niveles de mRNA se cuantificaron utilizando oligonucleótidos y sondas del sistema UPL (Universal Probe Library, Roche Life Science) en el aparato LightCycler 480 (Roche Life Science). La determinación se realizó por triplicado en placas de 384 pocillos (Roche Life Science) y se normalizó con respecto a los niveles de expresión de *TBP* o *HPRT1* (genes “house keeping”) y utilizando el método $\Delta\Delta CT$ (umbral de ciclo) para su cuantificación. Las secuencias de los oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación de cada gen analizado se indican en la Tabla suplementaria 1.

Análisis mediante plataforma Microarray.

El análisis global de la expresión génica global de tres muestras independientes de RNA de M-MØ no tratados (control), o tratados con BW723C86 (10 µM), SB204741 (1 µM), o SB204741+BW723C86 se llevó a cabo empleando Microarrays de Genoma Humano Total (Agilent Technologies). El RNA fue extraído con el kit RNeasy Mini kit (Qiagen) y utilizado para generar las sondas de hibridación. Para el análisis de la expresión génica diferencial (DGE) y el análisis estadístico sólo se consideraron las sondas con valores de señal >60% sobre la señal “background” en al menos una condición. El análisis estadístico para DGE se llevó a cabo utilizando la prueba t pareada de Bayes, implementada en el paquete Limma (<http://www.bioconductor.org>). Los valores de p se ajustaron para el test de múltiples hipótesis usando el método de Benjamini-Hochberg, con el objetivo de controlar el ratio de falso descubrimiento (FDR), siendo todos los procedimientos codificados en R (<http://www.r-project.org>). Los datos se depositaron en el Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) con número de acceso GSE121825. El agrupamiento jerárquico no supervisado fue realizado con la media de nivel de expresión de los genes regulados significativamente por BW723C86 (p ajustada <0,002) con la aplicación ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>). Los genes expresados diferencialmente fueron analizados usando ENRICH (http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/), considerándose como significativo el enriquecimiento cuando el valor de la p ajustada Benjamini-Hochberg era inferior a 0,05. Para el análisis del enriquecimiento de conjuntos génicos (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) se emplearon los sets de genes previamente definidos, así como los “Pro-inflammatory gene set” y “Anti-inflammatory gene set” previamente definidos por nuestro grupo (GSE68061).

Análisis estadísticos.

El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante la comparativa de medias a través del valor de la t de Student (Student’s t test), considerándose significativos los valores de p<0,05 (*p<0,05; **p<0,01; y ***p<0,001).

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Tabla suplementaria 1. Oligonucleótidos usados en los ensayos de qRT-QPCR.

<i>TBP</i>	cggctgtttaactcgccttc	<i>HSD11B1</i>	caatggaagcattgtgtcg
	cacacgccaagaacagfga		ggcagcaaccattggataag
<i>CLEC5A</i>	acggctcattaccacaagg	<i>CD209</i>	cccagctcgtcgtaatcaa
	ctgcttgataaaattccagtc		gaagcggcttactctggaagac
<i>CYP1B1</i>	acgtaccggccactatcact	<i>HTR2B</i>	tgctggaggctcagaataagt
	ctcgagtctgcacatcagga		ttgcatgccagagagtcc
<i>AbRR</i>	gcaaaaccagagcagacac	<i>IGF1</i>	tgtaggagacagggcttita
	acagactgggtgggcttita		atccacgatgcctgtctga
<i>AbR</i>	agccggctgcagaaaacag	<i>HMOX1</i>	gggtgatagaagaggccaaga
	ttatgccgcttgggaaggatt		agctcctgcaactcctcaa
<i>MAF-B</i>	gcc ttg acc tgt ttg act tga	<i>SLC2A1</i>	ggttggccatactcatgacc
	gtg cgc tac tct cgc ett ag		cagataggacatccaggtagc
<i>IL-10</i>	tcactcatggcttftagatgc	<i>PKM2</i>	gccgttccctccagatca
	gtggagcaggtgaagaatgc		gtcccggcttcaactatgg
<i>INHBA</i>	ctcggagatcatcagcttgg	<i>HIF1a</i>	ttttcaagcagtaggaattgga
	ccttggaatctcgaagtgc		gtgatgtagtagctcatgatcg
<i>MMP12</i>	tgctactaccgtgggaaataag	<i>CD28</i>	cagtgccctttattttctgg
	aacactggtcttggctctcag		gtcatgttcatgtagtcactgtgc
<i>ALDH1A2</i>	tgctaccagggcttactga	<i>CCL18</i>	atggccctctgctcctgt
	tgctccaagtccagagtt		aatctgccaggaggtatagacg
<i>CCL17</i>	cgtggtaccagacatctgagg	<i>FCGBP</i>	ggcacagctgacatgatcc
	cctgccctgcacagttaca		gaaggtgagcagcccaagt
<i>PPARG2</i>	tcctgctgttatgggtgaa	<i>PFKP</i>	ctgatcatcgggtgattcg
	tgtgtcaaccatggctattc		gaccatggggacacagaact
<i>CCR2B</i>	tgagacaagccaagctga	<i>PDK1</i>	gcagaaaacagttggcctgt
	ttctgataaaccgagaacgagat		gagctaagacaatgcatgtagacg
<i>H6PD</i>	tgagatcatcatgaaagagacc	<i>HK3</i>	cctcccactgggttttacct
	gcgaatgacaccgtactcct		gaaacccttgggtccagttca
<i>TNF</i>	cagcctcttctccttct	<i>PDE2A</i>	acaggccgatggaatga
	gccagagggtgattaga		aacaggtcctgcaacagctt
<i>ACSL1</i>	ggagtgggctgcagtgac	<i>DCSTAMP</i>	gcatgcaagctgcttaaaa
	gggcttgcattgtcctgt		ggactggaagccagaaatga
<i>DUSP6</i>	ttggaacttactgaagccaact	<i>ACP5</i>	cggccacgatcacaactc
	cgactggaacgagaatacgg		gctttgaggggtccatga
<i>NCF4</i>	gcagcactcccctattgaaa	<i>CTSK</i>	gccagacaacagatttcc
	cagagctatgtcctctcttggga		cagagcaagctcaccac
<i>BMP6</i>	acatggtcatgagcttftga	<i>CALCR</i>	cgcttgcgggttattatct
	actctttgggtgctgctga		ggtaatagcatgtagtggttgg
<i>RGS16</i>	agggtccacctgtgagca	<i>TRAF 6</i>	tctctaccagcgccttg
	actcagagagggcacatcca		tgggtccctcagaagttcat
<i>CCL19</i>	gcctgctggttctctggac	<i>CA 2</i>	cacccctctcttctggaat
	ggatgggttctgggtcac		agtttacggaattcaacactg
<i>SOCS2</i>	cagtccaagecccttc	<i>C-FOS</i>	ctaccactaccgcagact
	aaggatgggctcttct		aggctcgtgcagaagtct
<i>ARNT2</i>	ttgcaggaattagtgcacg	<i>IRF8</i>	cagctcctccagactgggtg
	tggcttctctgggagtag		taggtgggttaccctgtcac
<i>TIPARP</i>	tctcaggctcccgttcag	<i>BCL6</i>	ttccgctacaagggaac
	tggtttccatttcataatgtg		tgcaacgatagggtttctca
<i>EREG</i>	tggctcttctcactcaggctc	<i>PRDM1</i>	acgtgtgggtacgaccttg
	cgtagtggcataggggaac		ctgccaatccctgaaacct
<i>SERPIN2</i>	catggagcatctgtccac	<i>MITF A</i>	caaaagtcaaccgtgaaga
	actgcattggctcccactt		aggagcttatcggaggcttg
<i>OCSTAMP</i>	cacgctcacggctcaagtatg	<i>MITF comun</i>	ccctcccttctcttca
	taggagctgtggacggagag		cattctctgggctgtctc
<i>TREM1</i>	ttacaatgtgacagatatcatcagg		
	aagaccaggtcttactcagga		

A

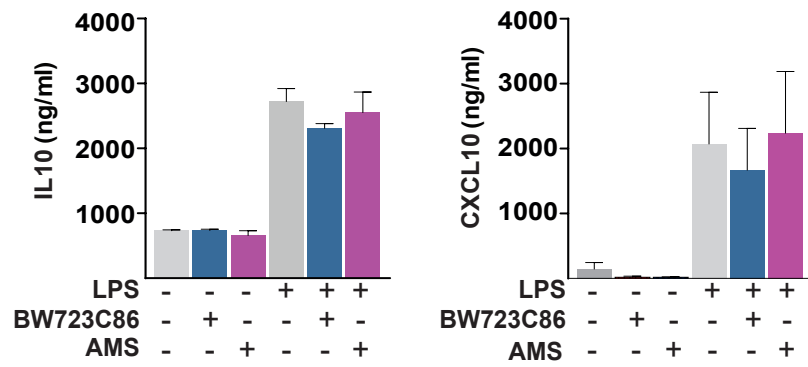


Figura Suplementaria 1. Análisis de la producción de citoquinas en respuesta a LPS de macrófagos tratados con BW723C86 y 5-HT. A. Producción de IL-10 y CXCL10 por M-MØ no tratados (-) o tratados con BW723C86 o AMS (6 h) y posteriormente estimulados con LPS (18h). Se muestran la media y el SEM (n=4).

REFERENCIAS

1. van Furth, R. et al. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* 46,845-852 (1972).
2. Hume, D. A. et al. The mononuclear phagocyte system revisited. *J. Leukoc. Biol.* 72, 621-627 (2002).
3. Stefater, J. A., Ren, S., Lang, R. A. & Duffield, J. S. Metchnikoff's policemen: Macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends in Molecular Medicine* 12,743-752 (2011).
4. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445-455 (2013).
5. Gomez, I., Duval, V. & Silvestre, J.-S. Cardiomyocytes and Macrophages Discourse on the Method to Govern Cardiac Repair. *Front. Cardiovasc. Med.* 5, 134-137 (2018).
6. Gomez Perdiguero, E. et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* .518, 547-551 (2015).
7. Hoeffel, G. et al. C-Myb+ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity.* 42, 665-678 (2015).
8. Ginhoux, F. & Guilliams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity.* 44, 439-449 (2016).
9. Cassetta, L. & Pollard, J. W. Targeting macrophages: Therapeutic approaches in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 887-904 (2018).
10. Murray, P. J. Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 541-566 (2017).
11. Tan, S. Y. S. & Krasnow, M. A. Developmental origin of lung macrophage diversity. *Dev.* 143, 1318-1327 (2016).
12. Ginhoux, F., Schultze, J. L., Murray, P. J., Ochando, J. & Biswas, S. K. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nature Immunology.* 17, 34-40 (2016).
13. Italiani, P. & Boraschi, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology .* 17,500-514 (2014).
14. Shibata, Y. et al. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity.* 15, 557-567 (2001).
15. Subramanian, V. & Ferrante, A. W. Obesity, inflammation, and macrophages. *Nestle Nutr. Work. Ser. Pediatr. Progr.* 63, 151-162 (2009).
16. Yoshida, H. et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345, 442-444 (1990).
17. Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A. & Merad, M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology.* 15, 731-744 (2015).
18. Stanley, E. R. & Heard, P. M. Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J. Biol. Chem.* 252, 4305-4312 (1977).
19. Stanley, E. R., Chen, D. M. & Lin, H. S. Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. *Nature* 13,168-170 (1978).
20. Hamilton, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 8, 533-544 (2008).
21. Hume, D. A. & MacDonald, K. P. A. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* (2012).
22. McDermott, R. S. et al. Circulating macrophage colony stimulating factor as a marker of tumour progression. *Eur. Cytokine Netw.* 13, 121-7. (2002).
23. Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G. & Pollard, J. W. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med.* (2001).

24. Bischof, R. J., Zafropoulos, D., Hamilton, J. A. & Campbell, I. K. Exacerbation of acute inflammatory arthritis by the colony-stimulating factors CSF-1 and granulocyte macrophage (GM)-CSF: Evidence of macrophage infiltration and local proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* 193, 727-740 (2000).
25. Pollard, J. W. et al. Apparent role of the macrophage growth factor, CSF-1, in placental development. *Nature.* 330, 484-486 (1987).
26. Luo, J. et al. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) signaling in injured neurons facilitates protection and survival. *J. Exp. Med.* 210, 157-172 (2013).
27. Bartocci, A. et al. Macrophages specifically regulate the concentration of their own growth factor in the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 6179-6183. (1987).
28. Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine.* 9, 669-676. (2003).
29. Dai, X. M., Zong, X. H., Sylvestre, V. & Stanley, E. R. Incomplete restoration of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) function in CSF-1-deficient *Csf1op/Csf1op* mice by transgenic expression of cell surface CSF-1. *Blood.* 103, 1114-1123 (2004).
30. Sasaki, A. et al. Effects of macrophage-colony-stimulating factor deficiency on the maturation of microglia and brain macrophages and on their expression of scavenger receptor. *Neuropathology.* 20, 134-142 (2000).
31. Gómez-Nicola, D., Fransen, N. L., Suzzi, S. & Hugh Perry, V. Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *J. Neurosci.* 33, 2481-2493 (2013).
32. Dai, X. M. et al. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood.* 99, 111-120 (2002).
33. Hume, D. A., Pavli, P., Donahue, R. E. & Fidler, I. J. The effect of human recombinant macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) on the murine mononuclear phagocyte system in vivo. *J. Immunol.* 141, 3405-3409 (1988).
34. Musameh, M. D., Green, C. J., Mann, B. E., Fuller, B. J. & Motterlini, R. Improved Myocardial Function After Cold Storage With Preservation Solution Supplemented With a Carbon Monoxide-Releasing Molecule (CORM-3). *J. Hear. Lung Transplant.* 136, 1067-1075 (2007).
35. Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. Correction by CSF-1 of defects in the osteopetrotic *op/op* mouse suggests local, developmental, and humoral requirements for this growth factor. *Exp. Hematol.* 19, 1049-1055 (1991).
36. Pixley, F. J. & Stanley, E. R. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: Complexity in action. *Trends in Cell Biology.* 14, 628-638 (2004).
37. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6, 13-15 (2014).
38. Rademakers, R. et al. Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nat. Genet.* 44, 200-205 (2012).
39. Tobal, K. et al. Mutation of the human FMS gene (M-CSF receptor) in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 4, 486-489 (1990).
40. Toh, M. L. et al. Bone- and cartilage-protective effects of a monoclonal antibody against colony-stimulating factor 1 receptor in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 66, 2989-3000 (2014).
41. Menke, J. et al. Distinct roles of CSF-1 isoforms in lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 1821-1833 (2011).
42. Sierra-Filardi, E. et al. CCL2 Shapes Macrophage Polarization by GM-CSF and M-CSF: Identification of CCL2/CCR2-Dependent Gene Expression Profile. *J. Immunol.* 192, 3858-3866 (2014).
43. Sawanobori, Y. et al. Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood.* 18, 50-61(2008).
44. Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity.* 17, 49-61 (2014).
45. Qian, B. Z. & Pollard, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell.* 141, 39-51

(2010).

46. Zhang, Q. wen et al. Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophages in Solid Tumor: A Meta-Analysis of the Literature. *PLoS One*. 7, 12-18(2012).
47. Strachan, D. C. et al. CSF1R inhibition delays cervical and mammary tumor growth in murine models by attenuating the turnover of tumor-associated macrophages and enhancing infiltration by CD8+ T cells. *Oncoimmunology*. 2,12-12 (2013).
48. Pyonteck, S. M. et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* 23, 45-51 (2013).
49. Ries, C. H., Hoves, S., Cannarile, M. A. & Rüttinger, D. CSF-1/CSF-1R targeting agents in clinical development for cancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*. 9, 64-72 (2015).
50. Genovese, M. C. et al. Results from a phase IIA parallel group study of JNJ-40346527, an oral CSF-1R inhibitor, in patients with active rheumatoid arthritis despite disease-modifying antirheumatic drug therapy. *J. Rheumatol.* 42, 52-60 (2015).
51. Wang, Y. & Colonna, M. Interleukin-34, a cytokine crucial for the differentiation and maintenance of tissue resident macrophages and Langerhans cells. *Eur. J. Immunol.* 44, 1575-1581 (2014).
52. Kim, J. H. & Kim, N. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J. Bone Metab.* 21, 233-241 (2014).
53. Asagiri, M. & Takayanagi, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40, 251-264 (2007).
54. Hamilton, J. A. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* 23, 3-8 (2002).
55. Gasson, J. C. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 77,31-45 (1991).
56. Sagawa, K. et al. Suppression by IL-10 and IL-4 of cytokine production induced by two-way autologous mixed lymphocyte reaction. *Cytokine*. 8,1-6 (1996).
57. Hamilton, J. A. Rheumatoid arthritis: opposing actions of haemopoietic growth factors and slow-acting anti-rheumatic drugs. *Lancet*. 342,536-9 (1993).
58. Parajuli, B. et al. GM-CSF increases LPS-induced production of proinflammatory mediators via upregulation of TLR4 and CD14 in murine microglia. *J. Neuroinflammation*. 9, 268-272 (2012).
59. Hamilton, J. A. & Tak, P. P. The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis and Rheumatism*. 60,1210-1221 (2009).
60. Cook, A. D. et al. Regulation of systemic and local myeloid cell subpopulations by bone marrow cell-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 63, 2340-2351 (2011).
61. Fleetwood, A. J., Lawrence, T., Hamilton, J. A. & Cook, A. D. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-Dependent Macrophage Phenotypes Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation. *J. Immunol.* 178, 5245-5252 (2007).
62. Paine, R. et al. Impaired functional activity of alveolar macrophages from GM-CSF-deficient mice. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, 1210-1218 (2001).
63. Martinez-Moczygamba, M. & Huston, D. P. Biology of common β receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 112, 653-665 (2003).
64. Bazan, J. F. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol. Today* 11, 350-354 (1990).
65. Van Leeuwen, B. H., Martinson, M. E., Webb, G. C. & Young, I. G. Molecular organization of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF genes, on human chromosome 5. *Blood*. 73, 1142-1148 (1989).
66. Guthridge, M. A. et al. Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells* 16, 301-313 (1998).
67. Woodcock, J. M., Bagley, C. J. & Lopez, A. F. The functional basis of granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interleukin-3 and interleukin-5 receptor activation, basic and clinical implications. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 89, 1471-1482 (1999).

68. Hansen, G. et al. The Structure of the GM-CSF Receptor Complex Reveals a Distinct Mode of Cytokine Receptor Activation. *Cell*. 134, 496-50 (2008).
69. Burgess, A. W., Camakaris, J. & Metcalf, D. Purification and properties of colony stimulating factor from mouse lung conditioned medium. *J. Biol. Chem.* 252, 1998-2003 (1977).
70. Sainathan, S. K. et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor ameliorates DSS-induced experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 88-99 (2008).
71. LeVine, A. M., Reed, J. A., Kurak, K. E., Cianciolo, E. & Whitsett, J. A. GM-CSF-deficient mice are susceptible to pulmonary group B streptococcal infection. *J. Clin. Invest.* (1999) 103, 563-569.
72. Hirata, Y., Egea, L., Dann, S. M., Eckmann, L. & Kagnoff, M. F. GM-CSF-Facilitated Dendritic Cell Recruitment and Survival Govern the Intestinal Mucosal Response to a Mouse Enteric Bacterial Pathogen. *Cell Host Microbe*. 18, 151-156 (2010).
73. McGeachy, M. J. GM-CSF: The secret weapon in the TH 17 arsenal. *Nat. Immunol.* 12, 521-522 (2011).
74. Codarri, L. et al. ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat. Immunol.* 12, 560-567 (2011).
75. Zhang, Y., Joe, G., Hexner, E., Zhu, J. & Emerson, S. G. Host-reactive CD8+ memory stem cells in graft-versus-host disease. *Nat. Med.* 11, 1299-1305 (2005).
76. Shi, Y. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: What we do and don't know. in *Cell Research*. 16, 126-133 (2006).
77. Young, A. et al. Cutting Edge: Suppression of GM-CSF Expression in Murine and Human T Cells by IL-27. *J. Immunol.* 189, 2079-2083 (2012).
78. Enzler, T. & Dranoff, G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. in *The Cytokine Handbook*. 12, 369-370 (2003).
79. Gonzalez-Juarrero, M. et al. Disruption of granulocyte macrophage-colony stimulating factor production in the lungs severely affects the ability of mice to control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Leukoc. Biol.* 77, 914-922 (2005).
80. Barouch, D. H. et al. Potent CD4 + T Cell Responses Elicited by a Bicistronic HIV-1 DNA Vaccine Expressing gp120 and GM-CSF. *J. Immunol.* 168, 562-568 (2002).
81. Baiocchi, R. A. et al. GM-CSF and IL-2 induce specific cellular immunity and provide protection against Epstein-Barr virus lymphoproliferative disorder. *J. Clin. Invest.* 108, 887-894 (2001).
82. Campbell, I. K. et al. Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *J. Immunol.* 161, 3639-3644. (1998).
83. Sonderegger, I. et al. GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *J. Exp. Med.* 205, 2281-2294 (2008).
84. McQualter, J. L. et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: A new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 194, 873-882 (2001).
85. Cook, A. D., Braine, E. L., Campbell, I. K., Rich, M. J. & Hamilton, J. A. Blockade of collagen-induced arthritis post-onset by antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): Requirement for GM-CSF in the effector phase of disease. *Arthritis Res.* 3, 293-298 (2001).
86. Trapnell, B. C. & Whitsett, J. A. GM-CSF Regulates Pulmonary Surfactant Homeostasis and Alveolar Macrophage-Mediated Innate Host Defense. *Annu. Rev. Physiol.* 168, 562-568 (2002).
87. Trapnell, B. C., Carey, B. C., Uchida, K. & Suzuki, T. Pulmonary alveolar proteinosis, a primary immunodeficiency of impaired GM-CSF stimulation of macrophages. *Current Opinion in Immunology*. 18, 52-58 (2009).
88. Okabe, Y. & Medzhitov, R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell*. 157, 832-844 (2014).
89. A-Gonzalez, N. et al. The nuclear receptor LXR α controls the functional specialization of splenic macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 831-839 (2013).

90. Nguyen, N. T. et al. Aryl hydrocarbon receptor and kynurenine: Recent advances in autoimmune disease research. *Front. Immunol.* 5, 551 (2014).
91. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* 8, 958-969 (2008).
92. Barron, L. & Wynn, T. A. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology.* 300, 723-728 (2011).
93. Roberts, A. B. et al. Transforming growth factor type β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4167-4171. (1986).
94. Newby, A. C. Metalloproteinase production from macrophages – a perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction. *Experimental Physiology* 101, 1327–1337 (2016).
95. Udalova, I. A., Mantovani, A. & Feldmann, M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology.* 12, 472-485 (2016).
96. Heppner, F. L., Ransohoff, R. M. & Becher, B. Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience.* 16, 358-372 (2015).
97. Cao, S., Liu, J., Song, L. & Ma, X. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J. Immunol.* 174, 3484–3492 (2005).
98. Spiller, K. L. & Koh, T. J. Macrophage-based therapeutic strategies in regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 16, 358-372 (2017).
99. Ponzoni, M., Pastorino, F., Di Paolo, D., Perri, P. & Brignole, C. Targeting macrophages as a potential therapeutic intervention: Impact on inflammatory diseases and cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* 4, 19 (2018).
100. Mills, C. D. & Ley, K. M1 and M2 macrophages: The chicken and the egg of immunity. *Journal of Innate Immunity* 6, 716-726 (2014).
101. Mills, C. D. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: A life or death issue. *Critical Reviews in Immunology.* 21, 399-425. (2001).
102. Mills, C. D. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease. *Crit. Rev. Immunol.* 32, 463-488 (2012).
103. Ruffell, B. & Coussens, L. M. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell.* 27, 462-472 (2015).
104. Hamilton, T. A., Zhao, C., Pavicic, P. G. & Datta, S. Myeloid colony-stimulating factors as regulators of macrophage polarization. *Front. Immunol.* 21,554 (2014).
105. Murray, P. J. et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41, 14-20 (2014).
106. Sierra-Filardi, E. et al. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood.* 117, 5092-5101 (2011).
107. Cuevas, V. D. et al. MAFB Determines Human Macrophage Anti-Inflammatory Polarization: Relevance for the Pathogenic Mechanisms Operating in Multicentric Carpotalar Osteolysis. *J. Immunol.* 198, 2070–2081 (2017).
108. Sierra-Filardi, E., Vega, M. A., Sánchez-Mateos, P., Corbí, A. L. & Puig-Kröger, A. Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. *Immunobiology.* 215, 788-795 (2010).
109. de las Casas-Engel, M. et al. Serotonin Skews Human Macrophage Polarization through HTR 2B and HTR 7. *J. Immunol.* 190, 2301-2310 (2013).
110. Rapport, m. M., green, A. a. & Page, i. H. serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *j. biol. chem.* 176, 1243-1251 (1948).
111. Cloëz-Tayarani, I. & Changeux, J.-P. Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective. *J. Leukoc. Biol.* 81, 599-560 (2007).
112. Mössner, R. & Lesch, K. P. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain. Behav. Immun.* 12, 249-271 (1998).

113. Ahern, G. P. 5-HT and the immune system. *Current Opinion in Pharmacology*, 11, 29-33 (2011).
114. Ernberg, M. Serotonin Receptors. in *Peripheral Receptor Targets for Analgesia: Novel Approaches to Pain Management*. 12, 243 - 274 (2009).
115. Ghia, J. E. et al. Serotonin Has a Key Role in Pathogenesis of Experimental Colitis. *Gastroenterology*. 137, 1649-1660 (2009).
116. Kim, J. J. & Khan, W. I. 5-HT₇ receptor signaling: Improved therapeutic strategy in GUT disorders. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 8, 396 (2014).
117. Kim, J. J. et al. Targeted Inhibition of Serotonin Type 7 (5-HT₇) Receptor Function Modulates Immune Responses and Reduces the Severity of Intestinal Inflammation. *J. Immunol.* 1;190, 4795-4804 (2013).
118. Chabbi-Achengli, Y. et al. Serotonin is involved in autoimmune arthritis through th17 immunity and bone resorption. *Am. J. Pathol.* 186, 927-937 (2016).
119. Launay, J. M. et al. Serotonin 5-HT_{2B} receptors are required for bone-marrow contribution to pulmonary arterial hypertension. *Blood*. 119, 1772-1780 (2012).
120. Esteve, J. M., Launay, J. M., Kellermann, O. & Maroteaux, L. Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 47, 33-44 (2007).
121. Morita, T. et al. HTR₇ Mediates Serotonergic Acute and Chronic Itch. *Neuron*. 87, 124-38 (2015).
122. Jeffery, P. K., Kay, A. B. & Hamid, Q. Pathology of Asthma. in *Allergy and Allergic Diseases, Second Edition*. 4, 263 (2009).
123. Dees, C. et al. Platelet-derived serotonin links vascular disease and tissue fibrosis. *J. Exp. Med.* 208, 961-972. (2011).
124. El Oussini, H. et al. Serotonin 2B receptor slows disease progression and prevents degeneration of spinal cord mononuclear phagocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 131, 465-480 (2016).
125. Nocito, A. et al. Serotonin regulates macrophage-mediated angiogenesis in a mouse model of colon cancer allografts. *Cancer Res.* 68, 5152-5158 (2008).
126. Sibon, D. et al. Enhanced Renewal of Erythroid Progenitors in Myelodysplastic Anemia by Peripheral Serotonin. *Cell Rep.* 19, :3246-3256 (2019).
127. Ye, J. Y. et al. Serotonin enhances megakaryopoiesis and proplatelet formation via p-Erk1/2 and F-actin reorganization. *Stem Cells*. 32, 2973-2982 (2014).
128. Fouquet, G., Coman, T., Hermine, O. & Côté, F. Serotonin, hematopoiesis and stem cells. *Pharmacological Research* 140, 67-74 (2019).
129. Benedict, C. R., Mathew, B., Rex, K. A., Cartwright, J. & Sordahl, L. A. Correlation of plasma serotonin changes with platelet aggregation in an in vivo dog model of spontaneous occlusive coronary thrombus formation. *Circ. Res.* 58, 58-67 (1986).
130. Davis, r. b., Meeker, w. r. & Mcquarrie, d. g. immediate effects of intravenous endotoxin on serotonin concentrations and blood platelets. *circ. res.* 8, 234-239 (1960).
131. Finocchiaro, L. M. e. et al. Serotonin and Melatonin Synthesis in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Stimulation by Interferon- γ as Part of an Immunomodulatory Pathway. *J. Interferon Res.* 8, 705-716 (1988).
132. Abdouh, M., Albert, P. R., Drobetsky, E., Filep, J. G. & Kouassi, E. 5-HT_{1A}-mediated promotion of mitogen-activated T and B cell survival and proliferation is associated with increased translocation of NF- κ B to the nucleus. *Brain. Behav. Immun.* 1, 345-349 (2004).
133. Hernandez, M. E. et al. Evaluation of the effect of selective serotonin-reuptake inhibitors on lymphocyte subsets in patients with a major depressive disorder. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 20, 88-95 (2010).
134. Kushnir-Sukhov, N. M. et al. 5-Hydroxytryptamine Induces Mast Cell Adhesion and Migration. *J. Immunol.* 177, 6422-6432 (2006).
135. Kang, B. N. et al. Regulation of Serotonin-Induced Trafficking and Migration of Eosinophils. *PLoS One*. 8, 1 (2013).

136. Holst, K. et al. The serotonin receptor 5-HT₇R regulates the morphology and migratory properties of dendritic cells. *J. Cell Sci.* 128, 2866-2880 (2015).
137. León-Ponte, M., Ahern, G. P. & O'Connell, P. J. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT₇ receptor. *Blood.* 109, 3139-3146 (2007).
138. Hellstrand, K. et al. Role of Serotonin in the Regulation of Interferon- γ Production by Human Natural Killer Cells. *J. Interferon Res.* 13, 33-38 (1993).
139. Kubera, M., Kenis, G., Bosmans, E., Scharpé, S. & Maes, M. Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of interferon- γ and interleukin-10. *Neuropsychopharmacology.* 23, 89-98. (2000).
140. Cloëz-Tayarani, I., Petit-Bertron, A. F., Venters, H. D. & Cavaillon, J. M. Differential effect of serotonin on cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells: Involvement of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors. *Int. Immunol.* 15, 233-240. (2003).
141. Dürk, T. et al. 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HT_R subtypes. *Int. Immunol.* 17, 599-606 (2005).
142. Idzko, M. et al. The Serotonergic Receptors of Human Dendritic Cells: Identification and Coupling to Cytokine Release. *J. Immunol.* 172, 6011-6019 (2004).
143. Müller, T. et al. 5-hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS One.* 19, 599-616 (2009).
144. Khan, S. M., Sung, J. Y. & Hébert, T. E. G $\beta\gamma$ subunits—Different spaces, different faces. *Pharmacological Research* 111, 434-441 (2016).
145. Smith, J. S., Lefkowitz, R. J. & Rajagopal, S. Biased signalling: From simple switches to allosteric microprocessors. *Nature Reviews Drug Discovery* . 17, 243-260 (2018).
146. Ranjan, R., Dwivedi, H., Baidya, M., Kumar, M. & Shukla, A. K. Novel Structural Insights into GPCR- β -Arrestin Interaction and Signaling. *Trends in Cell Biology.* 27, 851-862 (2017).
147. Grundmann, M. et al. Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nat. Commun.* 23, 341 (2018).
148. Masson, J., Emerit, M. B., Hamon, M. & Darmon, M. Serotonergic signaling: Multiple effectors and pleiotropic effects. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 1, 685-713 (2012).
149. Herr, N., Bode, C. & Duerschmied, D. The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Front. Cardiovasc. Med.* 20, 44-48 (2017).
150. Mikulski, Z. et al. Serotonin activates murine alveolar macrophages through 5-HT_{2C} receptors. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 299, 272-280 (2010).
151. Ménard, G., Turmel, V. & Bissonnette, E. Y. Serotonin modulates the cytokine network in the lung: Involvement of prostaglandin E₂. *Clin. Exp. Immunol.* 150, 340-348 (2007).
152. Seidel, M. F. et al. Serotonin mediates PGE₂ overexpression through 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptor subtypes in serum-free tissue culture of macrophage-like synovial cells. *Rheumatol. Int.* 28, 1017-1022 (2008).
153. Ruffell, D. et al. A CREB-C/EBP β cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17475-17480 (2009).
154. Domínguez-Soto, Á. et al. Serotonin drives the acquisition of a profibrotic and anti-inflammatory gene profile through the 5-HT₇R-PKA signaling axis. *Sci. Rep.* 104, 844-854 (2017).
155. Foguet, M. et al. Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus serotonin receptor. *EMBO J.* 11, 3481-348 (1992).
156. Nebigil, C. G. et al. Developmentally regulated serotonin 5-HT_{2B} receptors. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 19, 365-372 (2001).
157. Choi, D. S., Ward, S. J., Messaddeq, N., Launay, J. M. & Maroteaux, L. 5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development.* 124, 1745-1755 (1997).

158. Kolodziejczak, M. et al. Serotonin Modulates Developmental Microglia via 5-HT_{2B} Receptors: Potential Implication during Synaptic Refinement of Retinogeniculate Projections. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 1219–1230 (2015).
159. Conn, P. J. & Sanders-Bush, E. Selective 5-HT₂ antagonists inhibit serotonin stimulated phosphatidylinositol metabolism in cerebral cortex. *Neuropharmacology.* 23, 993-996 (1984).
160. Li, B. et al. Fluoxetine-mediated 5-HT_{2B} receptor stimulation in astrocytes causes EGF receptor transactivation and ERK phosphorylation. *Psychopharmacology (Berl).* 201, 443–58 (2008).
161. Szabo, A. et al. Immunomodulatory capacity of the serotonin receptor 5-HT_{2B} in a subset of human dendritic cells. *Sci. Rep.* 8, 1765-1769 (2018).
162. Aguilera-Montilla, N. et al. Aryl hydrocarbon receptor contributes to the MEK/ERK-dependent maintenance of the immature state of human dendritic cells. *Blood.* 121,108-117 (2013).
163. Jian, B. et al. Serotonin mechanisms in heart valve disease I: Serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor- β 1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. *Am. J. Pathol.* 161, 2111-2121 (2002).
164. Buskohl, P. R., Sun, M. L., Thompson, R. P. & Butcher, J. T. Serotonin potentiates transforming growth factor-beta3 induced biomechanical remodeling in avian embryonic atrioventricular valves. *PLoS One.*10,367-377 (2012).
165. Svejda, B. et al. Serotonin and the 5-HT₇ receptor: The link between hepatocytes, IGF-1 and small intestinal neuroendocrine tumors. *Cancer Sci.* 104, 844-855 (2013).
166. Pai, V. P., Marshall, A. M., Hernandez, L. L., Buckley, A. R. & Horseman, N. D. Altered serotonin physiology in human breast cancers favors paradoxical growth and cell survival. *Breast Cancer Res.* 11, 81-92 (2009).
167. Soll, C. et al. Expression of serotonin receptors in human hepatocellular cancer. *Clin. Cancer Res.* 51, 1244-1254 (2012).
168. Kennett, G. A., Bright, F., Trail, B., Baxter, G. S. & Blackburn, T. P. Effects of the 5-HT_{2B} receptor agonist, BW 723C86, on three rat models of anxiety. *Br. J. Pharmacol.* 117, 1443-1448 (1996).
169. Cussac, D. et al. Agonist-directed trafficking of signalling at serotonin 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C}-VSV receptors mediated Gq/11 activation and calcium mobilisation in CHO cells. *Eur. J. Pharmacol.* 594, 32-38. (2008).
170. Kennett, G. A., Trail, B. & Bright, F. Anxiolytic-like actions of BW 723C86 in the rat Vogel conflict test are 5-HT_{2B} receptor mediated. *Neuropharmacology.* ;37, 1603-1610 (1998).
171. Nic Dhonnchadha, B. Á., Bourin, M. & Hascoët, M. Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. *Behav. Brain Res.* 140, 203-214. (2003).
172. Aira, Z. et al. Transient, 5-HT_{2B} receptor-mediated facilitation in neuropathic pain: Up-regulation of PKC γ and engagement of the NMDA receptor in dorsal horn neurons. *Pain.* 154, 1865-1877. (2013).
173. Kennett, G. A., Ainsworth, K., Trail, B. & Blackburn, T. P. BW 723C86, a 5-HT_{2B} receptor agonist, causes hyperphagia and reduced grooming in rats. *Neuropharmacology.* 36, 233-239. (1997).
174. Oh, E. J. et al. A novel role of serotonin receptor 2B agonist as an anti-melanogenesis agent. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 546 (2016).
175. Hutcheson, J. D., Setola, V., Roth, B. L. & Merryman, W. D. Serotonin receptors and heart valve disease-It was meant 2B. *Pharmacology and Therapeutics* 132, 146–157 (2011).
176. Tharayil, V. S. et al. Lack of serotonin 5-HT_{2B} receptor alters proliferation and network volume of interstitial cells of Cajal in vivo. *Neurogastroenterol. Motil.* 12, 56-62 (2010).
177. Nebigil, C. G. et al. Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 15, 9508-9513 (2000).
178. Svejda, B. et al. The 5-HT_{2B} receptor plays a key regulatory role in both neuroendocrine tumor cell proliferation and the modulation of the fibroblast component of the neoplastic microenvironment. *Cancer.* 116(, 2902-2912. (2010).
179. Kim, H. et al. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat. Med.* 16, 804-808 (2010).
180. West, J. D. et al. Serotonin 2B receptor antagonism prevents heritable pulmonary arterial hypertension. *PLoS One*

11, 1115-1121 (2016).

181. Porvasnik, S. L. et al. PRX-08066, a novel 5-hydroxytryptamine receptor 2B antagonist, reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334, 364-372. (2010).
182. Zopf, D. A. et al. C-122, a novel antagonist of serotonin receptor 5-HT 2B, prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 670, 195-203. (2011).
183. Taraseviciene-Stewart, L. et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J.* 15, 427-38 (2001).
184. Bhat, L. et al. RP5063, a novel, multimodal, serotonin receptor modulator, prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 810, 83-91 (2017).
185. Reichenberg, A. et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch. Gen. Psychiatry* 58, 445-452. (2001).
186. Frick, L. R., Williams, K. & Pittenger, C. Microglial dysregulation in psychiatric disease. *Clinical and Developmental Immunology.* 10, 608-654 (2013).
187. Leonard, B. E. The immune system, depression and the action of antidepressants. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 76, 532-538. (2001).
188. Yirmiya, R., Rimmerman, N. & Reshef, R. Depression as a Microglial Disease. *Trends in Neurosciences.* 38, 637-658 (2015).
189. Dantzer, R. Cytokine-induced sickness behaviour: A neuroimmune response to activation of innate immunity. *European Journal of Pharmacology.* 500, 399-411 (2004).
190. Glaser, R., Robles, T. F., Sheridan, J., Malarkey, W. B. & Kiecolt-Glaser, J. K. Mild depressive symptoms are associated with amplified and prolonged inflammatory responses after influenza virus vaccination in older adults. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 1009-1014. (2003).
191. de Wit, L. et al. Depression and obesity: A meta-analysis of community-based studies. *Psychiatry Res.* 178, 230-235 (2010).
192. Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W. & Kelley, K. W. From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience.* 9, 46-56. (2008).
193. Palin, K. et al. TNF α -induced sickness behavior in mice with functional 55 kD TNF receptors is blocked by central IGF-I. *J. Neuroimmunol.* 187, 55-60 (2007).
194. Hernandez, M. E. et al. Effect of selective serotonin reuptake inhibitors and immunomodulator on cytokines levels: An alternative therapy for patients with major depressive disorder. *Clin. Dev. Immunol.* 83, 721-725 (2013).
195. Diaz, S. L. et al. 5-HT 2B receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. *Mol. Psychiatry* 17, 154-163 (2012).
196. Kudo, I. et al. The regulation mechanisms of AhR by molecular chaperone complex. *J. Biochem.* 163, 223-232 (2018).
197. Fukunaga, B. N., Probst, M. R., Reisz-Porszasz, S. & Hankinson, O. Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 29270-29278. (1995).
198. Gutiérrez-Vázquez, C., Quintana, F. J., Gutiérrez-Vázquez, C. & Quintana, F. J. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity.* 48, 19-33 (2018).
199. Esser, C., Rannug, A. & Stockinger, B. The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends in Immunology.* 30, 447-454 (2009).
200. Stockinger, B., Meglio, P. Di, Gialitakis, M. & Duarte, J. H. The Aryl Hydrocarbon Receptor: Multitasking in the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 403-432. (2014).
201. Petrusis, J. R., Kusnadi, A., Ramadoss, P., Hollingshead, B. & Perdew, G. H. The hsp90 co-chaperone XAP2 alters importin β recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 278, 2677-2685 (2003).

202. Enan, E. & Matsumura, F. 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. *Biochem. Pharmacol.* 52, 1599-1612 (1996).
203. Pappas, B. et al. p23 protects the human aryl hydrocarbon receptor from degradation via a heat shock protein 90-independent mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 152, 34-44 (2018).
204. Hankinson, O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 35,307-340 (1995).
205. Yao, E. F. & Denison, M. S. DNA Sequence Determinants for Binding of Transformed Ah Receptor to a Dioxin-Responsive Enhancer. *Biochemistry.* 31, 5060-5067 (1992).
206. Denison, M. S., Fisher, J. M. & Whitlock, James P., J. The DNA Recognition Site for the Dioxin-Ah Receptor Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 263, 17221-17224 (1988).
207. Nebert DW et al .Aryl hydrocarbon receptor (AHR): “pioneer member” of the basic-helix/loop/helix per-Arnt-sim (bHLH/PAS) family of “sensors” of foreign and endogenous signals. *Prog Lipid Res.* 67, 38-57 (2017).
208. Matsumura, F. The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. *Biochemical Pharmacology.* 263, 17221-17224 (2009).
209. Sakurai, S., Shimizu, T. & Ohto, U. The crystal structure of the AhRR–ARNT heterodimer reveals the structural basis of the repression of AhR-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 292, 17609-17616 (2017).
210. Mascanfroni, I. D. et al. Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- α . *Nat. Med.* 21, 638–646 (2015).
211. Swedenborg, E. & Pongratz, I. AhR and ARNT modulate ER signaling. *Toxicology.* 27, 197–211 (2010).
212. Murphy, K. A., Quadro, L. & White, L. A. The Intersection Between the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)- and Retinoic Acid-Signaling Pathways. *Vitamins and Hormones.* 75, 33-67. (2007).
213. Ohtake, F. et al. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545-50. (2003).
214. Bunaciu, R. P. & Yen, A. Activation of the aryl hydrocarbon receptor ahr promotes retinoic acid-induced differentiation of myeloblastic leukemia cells by restricting expression of the stem cell transcription factor Oct4. *Cancer Res.* 71, 2371-2380 (2011).
215. Luecke-Johansson, S. et al. A Molecular Mechanism To Switch the Aryl Hydrocarbon Receptor from a Transcription Factor to an E3 Ubiquitin Ligase. *Mol. Cell. Biol.* 47, 582-586 (2017).
216. Vogel, C. F. A. et al. RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.* 21, 2941-2955. (2007).
217. Vogel, C. F. A. et al. Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: A role for nuclear factor- κ B. *J. Biol. Chem.* 289, 1866-1875 (2014).
218. Iu, M. et al. RelB attenuates cigarette smoke extract-induced apoptosis in association with transcriptional regulation of the aryl hydrocarbon receptor. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 19-31 (2017).
219. Gerbal-Chaloin, S., Iankova, I., Maurel, P. & Daujat-Chavanieu, M. Nuclear receptors in the cross-talk of drug metabolism and inflammation. *Drug Metabolism Reviews* (2013).
220. Kimura, A. et al. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J. Exp. Med.* 206, 2027-2035 (2009).
221. Ding, J. et al. BCL6--regulated by AhR/ARNT and wild-type MEF2B--drives expression of germinal center markers MYBL1 and LMO2. *Haematologica.* 100, 801–9 (2015).
222. Koizumi, M. et al. Aryl hydrocarbon receptor mediates indoxyl sulfate-induced cellular senescence in human umbilical vein endothelial cells. *J. Atheroscler. Thromb.* 21, 904-916 (2014).
223. Wang, S. & Hankinson, O. Functional involvement of the Brahma/SWI2-related gene 1 protein in cytochrome P4501A1 transcription mediated by the aryl hydrocarbon receptor complex. *J. Biol. Chem.* 277, 11821-11827 (2002).

224. Nakahama, T. et al. Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the microRNA-132/212 cluster promotes interleukin-17-producing T-helper cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11964–11969 (2013).
225. Liu, C. C. et al. Micro124-mediated AHR expression regulates the inflammatory response of chronic rhinosinusitis (CRS) with nasal polyps. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 500, 145-151 (2018).
226. Quintana, F. J. et al. An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20768–20773 (2010).
227. Diani-Moore, S. et al. Discovery and biological characterization of 1-(1H-indol-3-yl)-9H-pyrido[3, 4-b]indole as an aryl hydrocarbon receptor activator generated by photoactivation of tryptophan by sunlight. *Chem. Biol. Interact.* 193, 119–128 (2011).
228. Denis, M., Cuthill, S., Wikström, A. C., Poellinger, L. & Gustafsson, J. Å. Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: A structural kinship with the glucocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 801–807 (1988).
229. Kou, W., Li, X., Yao, H., Zhang, C. & Wei, P. Hypoxia disrupts aryl hydrocarbon receptor signaling and the Th17 response in allergic rhinitis patients. *Mol. Immunol.* 101, 364-369 (2018).
230. Gagliani, N. et al. TH17 cells transdifferentiate into regulatory T cells uring resolution of inflammation. *Nature* 523, 221-225 (2015).
231. Wei, P. et al. An aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress the Th17 response in allergic rhinitis patients. *Lab. Investig.* 94, 528-535. (2014).
232. Chng, S. H. et al. Ablating the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in CD11c+ cells perturbs intestinal epithelium development and intestinal immunity. *Sci. Rep.* 6, 23820-23831 (2016).
233. Hauben, E. et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor promotes allograft-specific tolerance through direct and dendritic cell-mediated effects on regulatory T cells. *Blood.* 112, 1214-1222 (2008).
234. K., G., L., K., J., C. & M.-G., R. Aryl hydrocarbon receptor activation in dendritic cells by the small molecular weight compound (VAF347) promotes FoxP3-expressing T cell differentiation. *Clinical Immunology.* 73, 795-800 (2010).
235. Etmayer, P. et al. A novel low molecular weight inhibitor of dendritic cells and B cells blocks allergic inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 599-606. (2006).
236. Baba, N. et al. 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. *Hum. Immunol.* 73, 795–800 (2012).
237. Mezrich, J. D. et al. An Interaction between Kynurenine and the Aryl Hydrocarbon Receptor Can Generate Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 185, 3190-3198 (2010).
238. Ninomiya, S. et al. The Roles of Aryl Hydrocarbon Receptor in T Cells at IDO-Positive Tumor Microenvironment. *Blood.* 128, 3693-3693 (2016).
239. Nguyen, N. T. et al. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19961-19966 (2010).
240. Benson, J. M. & Shepherd, D. M. Dietary ligands of the aryl hydrocarbon receptor induce anti-inflammatory and immunoregulatory effects on murine dendritic cells. *Toxicol. Sci.* 124, 327-338(2011).
241. Bankoti, J. et al. Effects of TCDD on the fate of naive dendritic cells. *Toxicol. Sci.* 115, 422-434 (2010).
242. Jin, U. H. et al. Microbiome-derived tryptophan metabolites and their aryl hydrocarbon receptor-dependent agonist and antagonist activities. *Mol. Pharmacol.* 85, 777-788 (2014).
243. N'Diaye, M. et al. Aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo[a]pyrene. *J. Biol. Chem.* 281, 19906-19915 (2006).
244. Wagage, S. et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes IL-10 Production by NK Cells. *J. Immunol.* 192, 1661-1670. (2014).
245. Lee, J. A. et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates functional differentiation of mouse bone marrow-derived dendritic cells. Downregulation of RelB by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Lett.* 169, 82-90 (2007).

246. van Grevenynghe, J. et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Inhibit Differentiation of Human Monocytes into Macrophages. *J. Immunol.* 170, 2374–2381 (2003).
247. Goudot, C. et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity.* 47, 582–559 (2017).
248. Thordardottir, S. et al. The aryl hydrocarbon receptor antagonist StemRegenin 1 promotes human plasmacytoid and myeloid dendritic cell development from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 23, 955–967. (2014).
249. González-Domínguez, É. et al. Atypical Activin A and IL-10 Production Impairs Human CD16 + Monocyte Differentiation into Anti-Inflammatory Macrophages. *J. Immunol.* 196, 1327–1337 (2016).
250. Peng, L., Gu, L., Li, B. & Hertz, L. Fluoxetine and all other SSRIs are 5-HT_{2B} Agonists - Importance for their Therapeutic Effects. *Curr. Neuropharmacol.* 12, 365–379 (2014).
251. Sparfel, L. et al. Transcriptional signature of human macrophages exposed to the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *Toxicol. Sci.* 114, 247–259 (2010).
252. Lawrence, B. P. et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is essential for mediating the anti-inflammatory effects of a novel low-molecular-weight compound. *Blood.* 112, 1158–1165 (2008).
253. Tanaka, Y., Uchi, H., Hashimoto-Hachiya, A. & Furue, M. Tryptophan photoproduct FICZ upregulates IL1A, IL1B, and IL6 expression via oxidative stress in keratinocytes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2018).
254. Lovell, P. J. et al. A novel, potent, and selective 5-HT₇ antagonist: (R)-3-(2-(2-(4-methylpiperidin-1-yl)-ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl)phenol (SB-269970). *Journal of Medicinal Chemistry.* 43, 342–345 (2000).
255. Maroteaux, L. et al. New therapeutic opportunities for 5-HT₂ receptor ligands. *Pharmacology and Therapeutics* 170, 14–36 (2017).
256. Miwa, H. et al. Impairment of gastric accommodation induced by water-avoidance stress is mediated by 5-HT_{2B} receptors. *Neurogastroenterol. Motil.* 28, 765–778 (2016).
257. Belmer, A. et al. Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors. *Neuropsychopharmacology* 43, 1623–1632 (2018).
258. Doly, S. et al. Serotonin 5-HT_{2B} receptors are required for 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced hyperlocomotion and 5-HT release in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* 28, 2933–2940 (2008).
259. Martin, R. S. & Martin, G. R. Investigations into migraine pathogenesis: Time course for effects of m-CPP, BW723C86 or glyceryl trinitrate on appearance of Fos-like immunoreactivity in rat trigeminal nucleus caudalis (TNC). *Cephalalgia.* 21, 46–52 (2001).
260. Collet, C. et al. The serotonin 5-HT_{2B} receptor controls bone mass via osteoblast recruitment and proliferation. *FASEB J.* 22, 418–427 (2008).
261. Lo, R. & Matthews, J. High-resolution genome-wide Mapping of AHR and ARNT binding sites by CHIP-Seq. *Toxicol. Sci.* 130, 349–361 (2012).
262. Ismaiel, a M., Titeler, M., Miller, K. J., Smith, T. S. & Glennon, R. a. 5-HT₁ and 5-HT₂ binding profiles of the serotonergic agents alpha-methylserotonin and 2-methylserotonin. *J. Med. Chem.* 33, 755–758 (1990).
263. Riera-Borrull, M. et al. Correction: Palmitate Conditions Macrophages for Enhanced Responses toward Inflammatory Stimuli via JNK Activation. *J. Immunol.* 199, 3858–3869 (2019).
264. Zhao, B., Degroot, D. E., Hayashi, A., He, G. & Denison, M. S. Ch223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (dioxin) receptor. *Toxicol. Sci.* 117, 393–403 (2010).
265. Iversen, L. et al. Neurochemical profiles of some novel psychoactive substances. *Eur. J. Pharmacol.* 700, 147–151 (2013).
266. MacMillan, D. & McCarron, J. G. The phospholipase C inhibitor U-73122 inhibits Ca²⁺ release from the intracellular sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ store by inhibiting Ca²⁺ pumps in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 160, 1295–1301. (2010).
267. Ma, H. T. et al. Protein kinase C β and δ isoenzymes mediate cholesterol accumulation in PMA-activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 214–20 (2006).

268. Nordman, J. C. & Kabbani, N. Microtubule dynamics at the growth cone are mediated by $\alpha 7$ nicotinic receptor activation of a G α q and IP3 receptor pathway. *FASEB J.* 28, 2995-3006 (2014).
269. Freeman, A. K., Ritt, D. A. & Morrison, D. K. Effects of Raf Dimerization and Its Inhibition on Normal and Disease-Associated Raf Signaling. *Mol. Cell.* 49, 751-758. (2013).
270. Heusschen, R. et al. SRC kinase inhibition with saracatinib limits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Oncotarget.* 7, 30712-30729 (2016).
271. Kukita, T., Kukita, A., Harada, H. & Iijima, T. Regulation of osteoclastogenesis by antisense oligodeoxynucleotides specific to zinc finger nuclear transcription factors Egr-1 and WT1 in rat bone marrow culture system. *Endocrinology.* 138, 4384-4389 (1997).
272. Srivastava, S. et al. Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *J. Clin. Invest.* 102, 1850-1859 (1998).
273. Yang, M. et al. Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), a novel protein induced by RANKL that promotes osteoclast differentiation. *J. Cell. Physiol.* 215, 497-505 (2008).
274. Miyachi, Y. et al. The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis. *J. Exp. Med.* 207, 751-762 (2010).
275. Takayanagi, H. Osteoclast differentiation and activation. *Clinical calcium.* 17, 484-492 (2007).
276. Park, J. H., Lee, N. K. & Lee, S. Y. Current understanding of RANK signaling in osteoclast differentiation and maturation. *Molecules and Cells.* 40, 706-713 (2017).
277. Gonzalez-Dominguez, E. et al. CD163L1 and CLEC5A discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 98, 449-450. (2015).
278. Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O'Garra, A. & Stockinger, B. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J. Exp. Med.* 206, 43-49 (2009).
279. Kim, S. H. et al. Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o- tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Pharmacol.* 69, 1871-1878 (2006).
280. Mantovani, A., Sica, A. & Locati, M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity.* 23, 344-346 (2005).
281. Ramachandran, A., Marshall, E. S., Love, D. R., Baguley, B. C. & Shelling, A. N. Activin is a potent growth suppressor of epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* 285, 157-165 (2009).
282. Razanajaona, D. et al. Silencing of FLRG, an antagonist of activin, inhibits human breast tumor cell growth. *Cancer Res.* 67, 7223-7229 (2007).
283. Izquierdo, E. et al. Reshaping of Human Macrophage Polarization through Modulation of Glucose Catabolic Pathways. *J. Immunol.* 195, 2442-2451 (2015).
284. Diskin, C. & Pålsson-McDermott, E. M. Metabolic modulation in macrophage effector function. *Frontiers in Immunology.* 16, 553-565. (2018).
285. Takeda, N. et al. Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev.* 24, 491-501. (2010).
286. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation.* 121, 1779-1794 (2011).
287. Mosser, D. M. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73, 209-212 (2003).
288. Beischlag, T. V. et al. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression.* 18, 207-250 (2008).
289. Sierra-Filardi, E. et al. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification. *J. Immunol.* 192, 3858-3867 (2014).

290. Li, N. et al. Serotonin activates dendritic cell function in the context of gut inflammation. *Am. J. Pathol.* 178, 662-671 (2011).
291. Walker, E. A., Brown, E. K. & Sterious, S. N. In vivo Schild regression analyses using nonselective 5-HT_{2C} receptor antagonists in a rat operant behavioral assay. *Psychopharmacology (Berl)*. 193, 187-197 (2007).
292. Veldhoen, M. et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*. 453, 106-109 (2008).
293. Quintana, F. J. et al. Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453, 65-71 (2008).
294. Manzella, C. et al. Serotonin is an endogenous regulator of intestinal CYP1A1 via AhR. *Sci. Rep.* 8, 6103 (2018).
295. Cassetta, L., Cassol, E. & Poli, G. Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal*. 11, 2391-2402. (2011).
296. Ferenbach, D. & Hughes, J. Macrophages and dendritic cells: What is the difference? *Kidney International* 74, 5-7 (2008).
297. Millan, M. J., Marin, P., Bockaert, J. & Mannoury la Cour, C. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends in Pharmacological Sciences*. 29, 454-464 (2008).
298. Väänänen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. & Halleen, J. M. The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science*. 113, 377-381 (2000).
299. Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J. & Coumoul, X. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open* 7, 1-9 (2018).
300. Rothhammer, V. & Quintana, F. J. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 19, 184-197 (2019).
301. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1. in *Cambridge University Press*. 7, 345-350 (2007).
302. Schofield, C. J. & Ratcliffe, P. J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5, 343-354 (2004).
303. Menet, J. S., Pescatore, S. & Rosbash, M. CLOCK: BMAL1 is a pioneer-like transcription factor. *Genes Dev*. 28, 8-13 (2014).
304. Stevens, E. A., Mezrich, J. D. & Bradfield, C. A. The aryl hydrocarbon receptor: A perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*. 127, 299-311 (2009).
305. Cao, S., Liu, J., Song, L. & Ma, X. The Protooncogene c-Maf Is an Essential Transcription Factor for IL-10 Gene Expression in Macrophages. *J. Immunol.* 174, 3484-3492 (2005).
306. Apetoh, L. et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* 11, 854-861 (2010).
307. Spadaro, O. et al. IGF1 Shapes Macrophage Activation in Response to Immunometabolic Challenge. *Cell Rep.* 19, 225-234 (2017).
308. Puig-Kröger, A. et al. Folate receptor β is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory Macrophages. *Cancer Res.* 69, 9395-9403 (2009).
309. Domínguez-Soto, A. et al. Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin Expression on M2-Polarized and Tumor-Associated Macrophages Is Macrophage-CSF Dependent and Enhanced by Tumor-Derived IL-6 and IL-10. *J. Immunol.* (2011).
310. A-González, N. & Castrillo, A. Liver X receptors as regulators of macrophage inflammatory and metabolic pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 1812, 982-994 (2011).
311. Cui, G. et al. Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation. *J. Clin. Invest.* 121, 658-670. (2011).
312. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation

and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* 9, 213-219 (2003).

313. Castrillo, A. & Tontonoz, p. nuclear receptors in macrophage biology: At the Crossroads of Lipid Metabolism and Inflammation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 455-480 (2004).
314. Asquith, D. L. et al. The liver X receptor pathway is highly upregulated in rheumatoid arthritis synovial Macrophages and potentiates TLR-driven cytokine release. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 2024-2031 (2013).
315. Zhu, J. et al. Aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 expression in inflammatory macrophages through Src-STAT3 signaling pathway. *Front. Immunol.* 19, 2033-2041 (2018).
316. Cheon, H. J. et al. Signaling pathway for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced TNF- α production in differentiated THP-1 human macrophages. *Exp. Mol. Med.* 39, 524-534. (2007).
317. Drozdziak, A., Dziedziczko, V. & Kurzawski, M. IL-1 and TNF- α regulation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) expression in HSY human salivary cells. *Arch. Oral Biol.* 59, 434-439 (2014).
318. Tian, Y., Ke, S., Denison, M. S., Rabson, A. B. & Gallo, M. A. Ah receptor and NF- κ B interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J. Biol. Chem.* 274, 510-515 (1999).
319. Tian, Y., Rabson, A. B. & Gallo, M. A. Ah receptor and NF- κ B interactions: Mechanisms and physiological implications. *Chem. Biol. Interact.* 141, 97-115 (2002).
320. Kim, D. W. et al. The RelA NF- κ B subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene.* 19, 5498-5506 (2000).
321. Øvrevik, J. et al. AhR and Arnt differentially regulate NF- κ B signaling and chemokine responses in human bronchial epithelial cells. *Cell Commun. Signal.* 24, 12-48 (2014).
322. Lacey, D. C. et al. Defining GM-CSF- and Macrophage-CSF-Dependent Macrophage Responses by In Vitro Models. *J. Immunol.* 188, 5752-5765 (2012).
323. Chen, K., Kirber, M. T., Xiao, H., Yang, Y. & Keaney, J. F. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J. Cell Biol.* 181, 1129-1139 (2008).
324. Xu, Q. et al. NADPH oxidases are essential for macrophage differentiation. *J. Biol. Chem.* 291, 20030-20041 (2016).
325. Van den Bossche, J. et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep.* 17, 684-696 (2016).
326. Brand, A. et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab* 24, 657-671 (2016).
327. Langston, P. K., Shibata, M. & Horng, T. Metabolism supports macrophage activation. *Frontiers in Immunology.* 8, 61 (2017).
328. Odegaard, J. I. & Chawla, A. Alternative Macrophage Activation and Metabolism. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 275-297 (2011).
329. Palsson-Mcdermott, E. M. et al. Pyruvate kinase M2 regulates hif-1 α activity and il-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab.* 21, 65-80 (2015).
330. Luo, W. et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell.* ;145, 732-744 (2011).
331. Luo, W. & Semenza, G. L. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget.* 2, 551-556 (2011).
332. Bullen, J. W. et al. Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Sci. Signal.* 9, 430-456 (2016).
333. Epstein, A. C. R. et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 107, 43-54 (2001).
334. Nie, M., Blankenship, A. L. & Giesy, J. P. Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10, 17-27 (2001).

