



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

REGULACIÓN DE RORyt y RUNX-1 EN CÉLULAS
LINFOIDES INNATAS DE SANGRE PERIFÉRICA
MEDIADOS POR EL RECEPTOR DE ARIL
HIDROCARBUROS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Andrés González Méndez



Ciudad Universitaria, CDMX

2017

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** ENRIQUE ORTEGA SOTO
VOCAL: **Profesor:** MARIO ADAN MORENO EUTIMIO
SECRETARIO: **Profesor:** LUZ MARÍA MORA VELANDIA
1er. SUPLENTE: **Profesor:** JULIO CESAR MARTINEZ ÁLVAREZ
2° SUPLENTE: **Profesor:** OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA (UIMIQ), HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI. IMSS.

ASESOR DEL TEMA: CDRA. LUZ MARÍA MORA VELANDIA
(Nombre y firma)

SUSTENTANTE: ANDRÉS GONZÁLEZ MÉNDEZ
(Nombre y firma)

ÍNDICE

	Página
1. GLOSARIO.....	5
2. LISTA DE FIGURAS.....	6
3. RESUMEN.....	7
4. MARCO TEÓRICO	
4.1 Generalidades de las ILCs.....	8
4.2 Origen de las ILCs.....	9
4.3 Criterios de identificación y clasificación de ILCs.....	12
4.3.1 Subpoblaciones de ILCs.....	13
4.4 Activación de ILCs.....	15
4.4.1 Citocinas y factores transcripcionales.....	16
4.5 Generalidades del AhR.....	19
4.5.1 Función del AhR en ILCs.....	22
4.6 Interacción de factores transcripcionales (plasticidad de ILCs).....	24
4.7 ILCs en piel (generalidades y función).....	26
4.7.1 Subpoblaciones de ILCs en piel.....	27
4.7.2 Función del AhR en ILCs en piel.....	28
4.8 Antecedentes directos al trabajo.....	28
4.8.1 Clasificación de las ILCs de SP y piel.....	30
4.8.2 Expresión de citocinas.....	31
5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	33
6. OBJETIVO GENERAL.....	33
7. OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
8. HIPÓTESIS.....	33
9. MATERIALES Y MÉTODOS	
9.1 Muestras de sangre periférica.....	34
9.2 Obtención y conteo de PBMCs.....	34
9.3 Obtención de células de piel sana.....	34
9.3.1 Declaración de Ética.....	35
9.4 Ensayos de activación celular.....	35
9.5 Tinciones de inmunofluorescencia (tinciones de superficie e intracelulares).....	35

10.	RESULTADOS	
10.1	Identificación de ILCs en SP.....	37
10.2	Expresión de citocinas en ILCs de SP.....	38
10.3	Co-expresión de FT en ILCs de SP.....	39
10.4	Pruebas de viabilidad con un ligando endógeno (FICZ) del AhR.....	40
10.5	Evaluación de IL-17 e IL-22 en ILCs de SP en presencia de FICZ y coctel de activación de ILC3.....	41
10.6	Evaluación de IFN- γ en ILCs de SP en presencia de FICZ y coctel de activación de ILC1.....	42
10.7	Efecto de los cocteles de activación de ILC1/ILC3+FICZ sobre el fenotipo de las poblaciones Lin ⁻ CD123 ⁺ y Lin ⁻ CD127 ⁺ de SP.....	43
10.8	Regulación transcripcional tras la activación de ILCs de SP con un coctel de activación de ILC3 y un ligando endógeno del AhR.....	46
10.9	Expresión de CLA en ILCs de SP.....	48
10.10	Co-expresión de FT en ILCs de SP y piel.....	49
11.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	50
12.	CONCLUSIONES.....	56
13.	REFERENCIAS.....	57

1. GLOSARIO

AhR	Receptor de Aril Hidrocarburos (receptor de dioxinas)
AhRR	Represor del Receptor de Aril Hidrocarburos
ARNT	Translocador nuclear del AhR
CHILP	Precursor de células linfoides innatas de tipo cooperador
CLA	Antígeno leucocitario cutáneo
CLP	Progenitor Linfoide Común
CRTH2	Receptor quimioatrayente de prostaglandina D2 expresado en células Th2
EOMES	Eomesodermina
FICZ	6-formilindol[3,2-b]carbazol
FT	Factor de transcripción
GATA-3	Proteína de unión a GATA 3
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperacínil-(1)]etanosulfónico
HIF1β	Factor inducible por hipoxia 1 β
HSP90	Proteína de choque térmico 90
Id2	Inhibidor de la proteína de unión al DNA 2
ILCs	Células Linfoides Innatas
IL	Interleucina
Iono/PMA	Ionomicina / Forbol-12-Miristato-13-Acetato
LTi	Células inductoras de tejido linfoide.
MALT	Tejido linfoide asociado a Mucosas
NCR	Receptor de citotoxicidad natural
NES	Señales de exporte nuclear
NFIL3	Factor nuclear regulado por IL-3
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NKP	Precursor de células NK
NLS	Señales de localización nuclear
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PLZF	<i>Promyelocytic leukemia zinc finger ortholog</i>
SP	Sangre periférica
TCDD	2,3,7,8- tetraclorodibenzo-p-dioxina
T-bet	Factor de transcripción T-box específico de células T
Th	Linfocito T cooperador
Treg	Linfocito T regulador
TOX	Factor de selección de timocitos asociada a grupo de alta movilidad
ROR	<i>Receptor huérfano relacionado con RAR</i>
RUNX-1	Factor de transcripción relacionado con Runt-1
XAP2	Proteína X asociada al virus de hepatitis B2
XREs	Elementos de respuesta a xenobiótico

2. LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Desarrollo de las ILCs a partir de CLP.....	11
Figura 2. Clasificación de las tres subpoblaciones de ILCs.....	14
Figura 3. Mecanismo de activación transcripcional y regulación de la expresión del AhR.....	20
Figura 4. Identificación de poblaciones de ILCs en SP y piel de donadores sanos.....	29
Figura 5. Las ILCs Lin ⁻ CD123 ⁺ de SP tienen un fenotipo ILC2 mientras que en piel tienen un fenotipo mixto.....	30
Figura 6. Las ILCs Lin ⁻ CD123 ⁺ expresan una limitada cantidad de citocinas del perfil tipo Th.....	32
Figura 7. Identificación de dos poblaciones linaje negativas: ILCs Lin ⁻ CD127 ⁺ e ILCs Lin ⁻ CD123 ⁺ en SP.....	37
Figura 8. Las poblaciones de ILCs en SP activadas con Iono/PMA, no son capaces de producir IL-17 ni IL-22.....	38
Figura 9. Las poblaciones de ILCs en SP co-expresan: AhR, ROR γ t, RUNX-1 y T-bet.....	39
Figura 10. La viabilidad celular se mantiene durante la activación con FICZ.....	40
Figura 11. ILCs de SP no son capaces de producir IL-17 ni IL-22 tras la estimulación con FICZ.....	41
Figura 12. Producción de IFN- γ en ILCs de SP en presencia de un coctel de activación de ILC1.....	42
Figura 13. La población Lin ⁻ CD123 ⁺ de SP modifica su fenotipo de ILC2 a ILC1 tras la estimulación con el coctel de activación de ILC1 e Iono/PMA.....	44
Figura 14. Población Lin ⁻ CD127 ⁺ de SP modifica sus fenotipos bajo condiciones de estimulación.....	45
Figura 15. Aumento en la expresión (Fold Increase) de ROR γ t y RUNX-1 en respuesta a C. IL3 y C. ILC3 + FICZ.....	47
Figura 16. Expresión de CLA en la población Lin ⁻ CD123 ⁺ y Lin ⁻ CD127.....	48
Figura 17. Co-expresión de FT en ILC de SP y Piel.....	49
Figura 18. Regulación negativa de IL-17 e IL-22 en ILCs de SP mediado por T-bet-RUNX-1.....	56

3. **RESUMEN**

Las células linfoides innatas (ILCs) son un grupo de células de origen hematopoyético recientemente descrito que participan en la iniciación, regulación y resolución de la inflamación en diversos órganos y tejidos como intestino, pulmones, piel e hígado, formando un puente entre el sistema inmune innato y adaptativo por su capacidad de producir citocinas que modulan la respuesta de ambos sistemas. Las ILCs se han clasificado en tres grupos: ILC1, ILC2 e ILC3 de acuerdo a la expresión de factores de transcripción (FT), diversos marcadores de superficie y perfil de citocinas que producen. En la actualidad, existen pocos estudios sobre la regulación transcripcional en ILCs y el impacto que tiene dicha regulación sobre la diferenciación de cada subpoblación de ILCs y la producción de citocinas. Tal es el caso del receptor del Aril hidrocarburos (AhR) y el FT relacionado a Runt-1 (RUNX-1) los cuales se han descrito que regulan el desarrollo y activación de las ILCs en ratón. Nuestro grupo de trabajo ha reportado que en sangre periférica (SP) existen al menos dos poblaciones de ILCs: ILCs "Clásicas" ($\text{Lin}^- \text{CD127}^+$) e ILC-like ($\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{baja}}$). En este trabajo se evaluó la expresión del AhR en ambas poblaciones de SP humana y el efecto que tiene el AhR al ser activado con un ligando endógeno del AhR (6-formilindol[3,2-b]carbazol (FICZ)) y un cóctel de activación de ILC3 (IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7 e IL-23) sobre la expresión de ROR γ t, T-bet, RUNX-1, IL-17 e IL-22.

Se determinó que las ILCs $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ de SP y piel expresan el AhR; la activación con citocinas o FICZ no indujeron la producción de IL-17 ni IL-22. Sin embargo, encontramos que el cóctel de activación de ILC3 más FICZ inducen una mayor expresión de ROR γ t y RUNX-1, mientras que la expresión de T-bet, se mantuvo constante. Los resultados sugieren que T-bet puede estar modulando una regulación negativa de la expresión de IL-17 e IL-22 en ILCs de SP.

4. **MARCO TEÓRICO.**

4.1 **Generalidades de las ILCs.**

La familia de ILCs se compone de diversas subpoblaciones, todas derivadas de un progenitor linfoide común (CLP), las cuales incluyen a las células *Natural Killer* (NK), células inductoras de tejido linfoide (LTi) y adicionalmente tres poblaciones denominadas: ILC1, ILC2 e ILC3. ^{1,2}

Debido a su gran heterogeneidad se han definido diversos criterios que permiten su identificación, entre los cuales se encuentran: 1) Son células linaje negativas (CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD94⁻, CD11c⁻, CD34⁻)³; 2) expresan los factores de transcripción (FT): Inhibidor de la proteína de unión al DNA 2 (Id2), *Promyelocytic leukemia zinc finger ortholog*, por sus siglas en inglés (PLZF) y el factor nuclear regulado por IL-3 (NFIL3),² 3) poseen morfología linfoide clásica,² 4) expresan la cadena alfa del receptor de IL-7 (CD127) y CD132 (cadena γ común).⁴

Se ha descrito que las ILCs son importantes en el inicio de la respuesta inmune contra infecciones⁵ y son capaces de modular la respuesta inmune mediante la producción de citocinas. Se ha propuesto que estas células pueden participar en una serie de trastornos inflamatorios en: pulmones, intestino y piel, por lo cual estas células son potenciales blancos terapéuticos.⁶

4.2 Origen de las ILCs.

La gran diversidad de células del sistema inmune tienen como origen común a la célula troncal hematopoyética pluripotencial, de la cual se derivan los progenitores comunes mieloides (CMP) y linfoides (CLP). Los progenitores pluripotenciales expresan una cinasa de tirosina receptora de superficie celular conocida como FLT3 o CD135, que se une a su ligando en membrana sobre células estromales. La señalización por medio de FLT3 es necesaria para la diferenciación de los progenitores pluripotenciales a CLP. Posteriormente la diferenciación de las células linfoides se acompaña de la expresión de la cadena alfa del receptor para IL-7 (CD127), que es inducido por emisión de señales de FLT3 junto con la actividad del factor de transcripción PU.1. La IL-7 secretada por células del estroma, es esencial para el crecimiento y supervivencia de las células linfoides.⁷

El mecanismo que regula la diferenciación de las ILCs en humano aún no se conoce detalladamente; en modelos murinos, se propone que su desarrollo es a partir del CLP en hígado fetal y médula ósea⁸ de manera Id2 dependiente⁹ (Figura 1.). Se sabe que el FT represor Id2, tiene la capacidad de antagonizar la actividad de la proteína-E requeridas para el desarrollo de linfocitos T y B⁹ tales como: E2A, E2-2 y HEB. En el caso de EBF-1 es bloqueado por GATA-3, otro FT descrito para la maduración de ILCs¹⁰, el cual se requiere durante el desarrollo del linaje temprano.¹¹

Otros factores de transcripción relevantes en el desarrollo de ILCs son: el factor 1 de células T (TCF-1), el factor de selección de timocitos asociada a grupo de alta movilidad (TOX) y el factor nuclear regulado por IL-3 (NFIL3).^{11,12}

Se desconoce la jerarquía transcripcional de TOX y NFIL3, pero se sabe que su expresión es simultánea. Se asocia la expresión de TOX con una regulación a la alta de Id2, necesaria para la represión de TCF-1.¹¹

La expresión de TCF-1 se asocia con el desarrollo de linfocitos T¹³, TOX se relaciona con el desarrollo de células LTi y NK¹⁴ y NFIL3 se asocia a la regulación del perfil de citocinas de Th2 y Th17.¹⁵ Se ha determinado la capacidad de NFIL3 de regular la expresión de Id2 y TOX en precursores de ILCs.¹² En ratones deficientes de NFIL3, no se detecta la presencia del precursor de ILCs Id2⁺ PLZF⁺,¹⁵ denotando la importancia de su expresión en el desarrollo de ILCs.

Al desarrollarse el CLP, puede dividirse en dos precursores: 1) precursor de células *Natural Killer* (NKP) caracterizado por la expresión del FT eomesodermina (EOMES) y 2) el precursor de células linfoides innatas de tipo cooperador (CHILP) el cual expresa PLZF y va disminuyendo conforme avanza el proceso de maduración.^{10,12} PLZF es un factor transcripcional involucrado en ciclo celular, desarrollo y diferenciación de células T CD4⁺.^{1,16,17} Dicho FT divide los grupos de ILCs en: PLZF dependientes (ILC1, 2 y 3) y los PLZF independientes (LTi)¹⁰, como se muestra en la Figura 1.

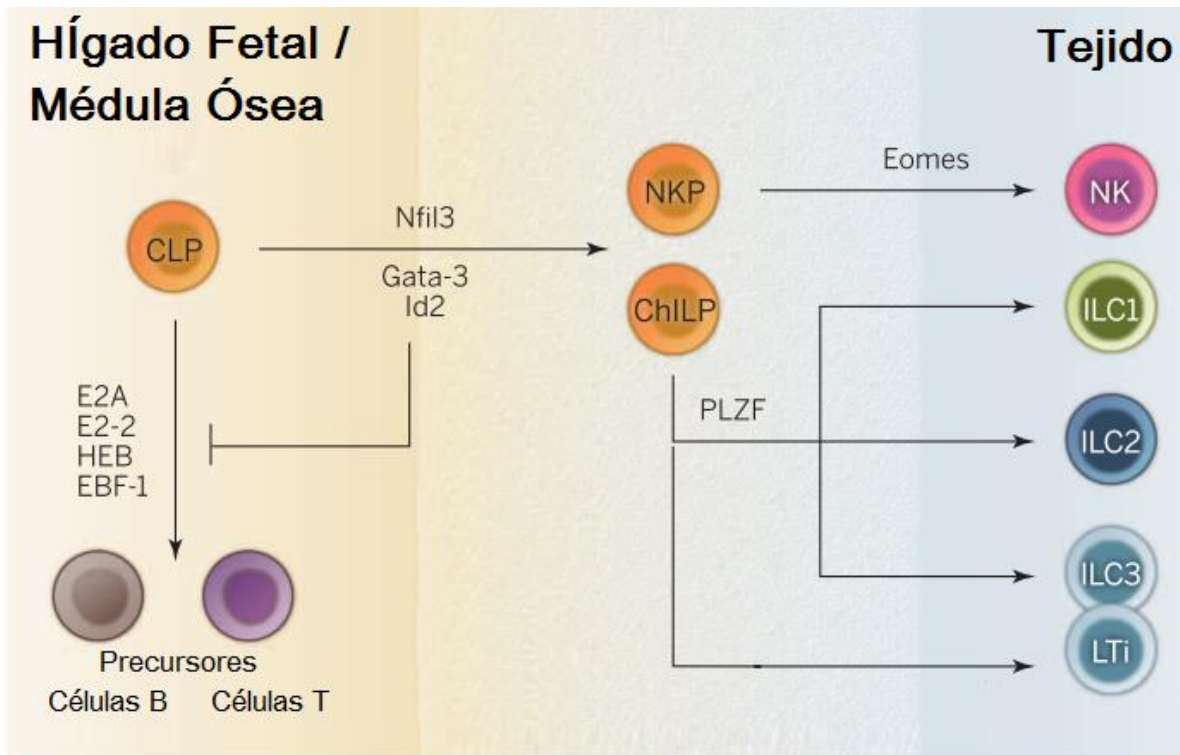


Figura 1. Desarrollo de las ILCs a partir de CLP. El precursor de células linfoides innatas de tipo cooperador (CHILP), requiere de la expresión de NFIL3, GATA-3 e Id2. Para el desarrollo de las ILCs, es necesaria la expresión de PLZF. Modificado de Eberl Gérard, Colonna Marco, Di Santo James P, *et al.* (2015)¹⁰

4.3 Criterios de identificación y clasificación de ILCs.

El estudio de las ILCs inició con dos grupos prototipo de la familia de ILCs, células NK y células LTi. Las NK se describieron por primera vez en 1975² en ratón y humano y se caracterizan por la capacidad de producir IFN- γ y TNF- α .⁵ Las células NK se clasificaron a partir de la expresión de CD161, CD94, los receptores de citotoxicidad natural (NCR) NKp44 en humano, NKp46 tanto en humano como en ratón y la expresión del factor de transcripción T-box específico de células T (T-bet) y el FT EOMES.⁵ Posteriormente, se identificó una población celular la cual no expresaba los marcadores clásicos de células NK, clasificada como CD161⁺ T-bet⁺ EOMES⁻ productora de IFN- γ (posteriormente nombrada ILC1).⁵ Este hallazgo marcó la pauta para continuar investigando nuevas poblaciones de ILCs. Las células LTi se identificaron en 1997 como esenciales para la formación de ganglios linfáticos durante la embriogénesis y también están presentes en intestino de neonatos, cooperando en la formación de estructuras linfoides², además de tener la capacidad de producir IL-17 e IL-22.¹⁸ Las células NK y LTi se relacionan por el requerimiento de la cadena gamma común (γ c) del receptor de IL-2 (CD132), CD161 y la expresión de Id2 para su desarrollo.^{2,19} A partir de estas células prototipo de la familia de ILCs, se han descrito nuevas poblaciones con los mismos requerimientos de CD132 y como criterios nuevos, se incluyó la expresión de CD90 (observado en la mayoría de ILCs de ratón).⁵ Cada una de estas nuevas poblaciones de ILCs tienen distintos patrones de producción de citocinas, siendo similares a los perfiles de citocinas secretadas por los linfocitos T cooperadores (Th).²⁰⁻²¹ Posteriormente, se fueron describiendo células que comparten características de células NK y LTi; células de origen linfoide, que se caracterizan por la expresión de CD127 y factores de transcripción relacionados con el perfil Th1, Th2 y Th17/22.¹⁸

4.3.1 **Subpoblaciones de ILCs.**

Se ha propuesto una nomenclatura, según la funcionalidad de cada grupo de ILCs, con la finalidad de comprender y definir los principios generales que dirigen el desarrollo de cada grupo de ILCs a partir de precursores hematopoyéticos.²² Se ha propuesto que las ILCs se pueden subdividir en dos grandes grupos: ILCs citotóxicas (caracterizadas por las células NK) e ILCs de tipo cooperador (ILC1, ILC2 e ILC3), las cuales pueden distinguirse basándose en la expresión de marcadores de superficie y FT¹¹ (Figura 2). Esta clasificación aún se encuentra en discusión dado que no se ha descartado que las ILCs cooperadoras pueden llegar a tener funciones citotóxicas.

Subpoblaciones de ILCs:

Las ILCs del grupo 1 conformado por células NK e ILC1, las cuales se encuentran en tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), amígdalas e intestino, también se ha reportado su presencia en hígado, piel, endometrio y útero.⁸ Las células NK se identifican mediante la expresión de: CD103, CD56, CD94 y NKp44⁸ y la co-expresión de los FT T-bet/EOMES,² mientras que las ILC1 expresan T-bet², CD161²³, CD127³ y además son CRTH2⁻ y c-Kit⁻.²⁴

Las ILCs del grupo 2 se encuentran en: SP, pulmones, intestino fetal, piel, amígdalas y tejido adiposo. Además de la expresión de CD161, también expresan: CD127, IL-2R α , IL-33R, CRTH2⁸ y co-expresan los FT ROR α y Gata-3.²

Las ILCs del grupo 3 conformado por las células LTi, ILC3 NCR⁻ e ILC3 NCR⁺, expresan CD127, c-Kit (CD117) y dependiendo de la expresión del receptor de citotoxicidad nuclear, se clasifican en NCR⁺ o NCR⁻ (en humano se expresa NKp44 y en ratón, NKp46¹⁰). Las células LTi se

caracterizan por la expresión del receptor de la quimiocina CCR6 y CD4, siendo la población dominante de ILCs durante la embriogénesis y las primeras semanas de vida¹¹, con la finalidad de generar órganos linfoides, el desarrollo de nódulos linfáticos y placas de Peyer.²⁵

Las ILC3 se han aislado de amígdalas, intestino, bazo, endometrio, piel y pulmones.⁸ Las tres poblaciones de ILC3 son capaces de co-expresar ROR γ t y el receptor de Aril hidrocarburos (AhR). En el caso específico de ILC3 NCR⁺ se ha observado también la co-expresión de T-bet.²

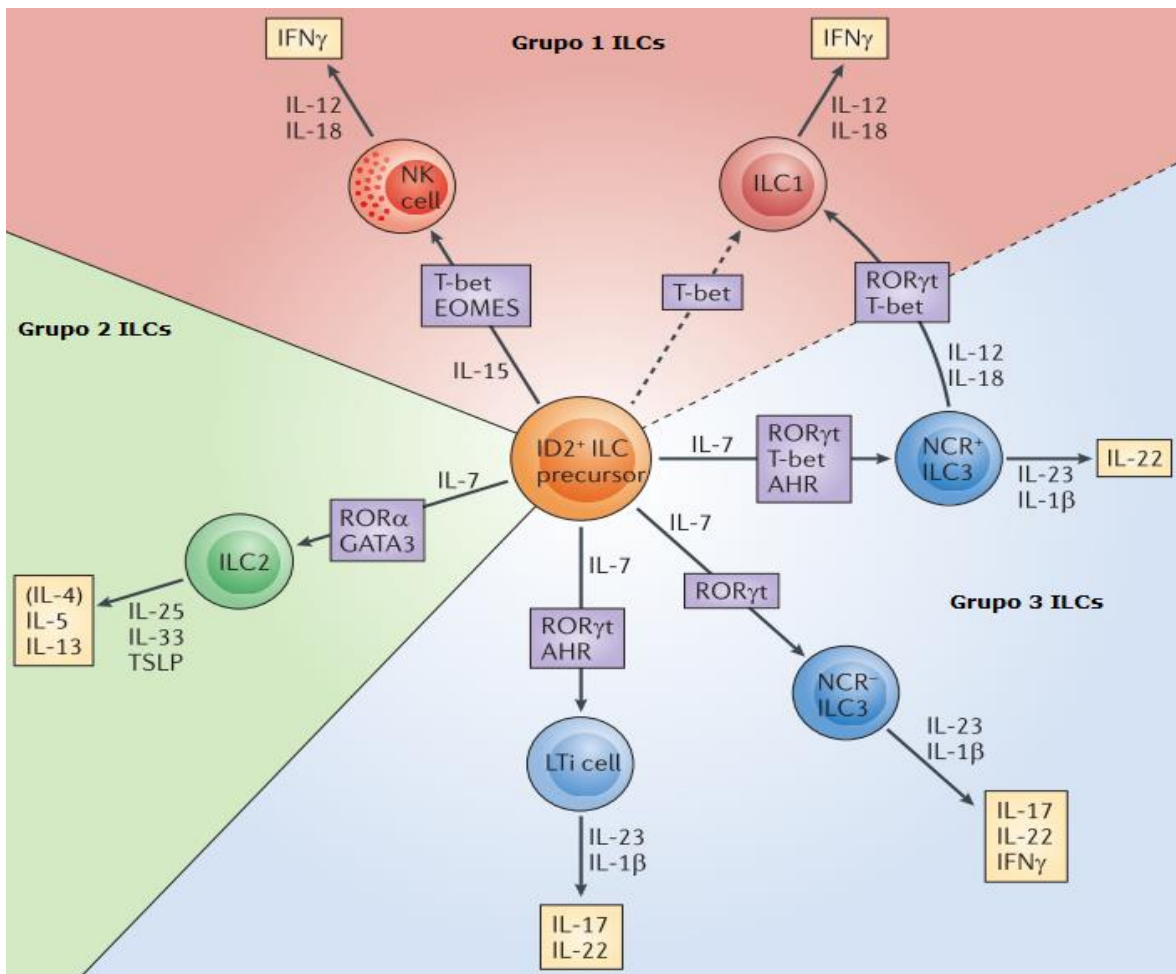


Figura 2. Clasificación de las tres subpoblaciones de ILCs. Para su estudio, se clasificaron en tres subpoblaciones con base en su perfil de citocinas y expresión de factores transcripcionales en ILC1, 2 y 3. Modificado de Spits Hergen, Artis David, Colonna Marco, *et al.* (2013)²

4.4 Activación de ILCs.

En ausencia de receptores antígenos específicos, las ILCs se activan principalmente a través de las citocinas presentes en el microambiente en el que se encuentren.²⁶ (Figura 2.)

Grupo 1: Su activación depende de las citocinas IL-12, IL-15 y IL-18 producidas por células del linaje mieloide (células dendríticas, neutrófilos y monocitos),²³ así como por células no hematopoyéticas.¹⁰ También son capaces de responder en tejidos después de una infección o lesión debido al reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) tales como lipopolisacárido, peptidoglicanos y flagelina.^{8,27}

Grupo 2: Requieren de citocinas derivadas del epitelio como IL-25, IL-33, linfopoyetina estromal tímica (TSLP) y metabolitos de ácido araquidónico, los cuales se generan durante una respuesta a infecciones parasitarias, alérgenos o lesiones epiteliales.¹⁰

Grupo 3: Responden principalmente a IL-1 β e IL-23, producidas por macrófagos y células dendríticas respectivamente,²³ en respuesta a infecciones bacterianas y fúngicas. Dentro de las subpoblaciones, en ratón, el receptor NKp46 no es capaz de activar a las ILC3 NCR⁺ en respuesta contra infecciones bacterianas.¹⁰ En humano, el receptor NKp44 tiene la capacidad de activar a las ILC3 NCR⁺ dando como resultado la producción de TNF, mientras que el estímulo de IL-1 β e IL-23 promueve la producción de IL-22 en ILC ROR γ t⁺ de amígdalas.²⁸

Otra propuesta sobre la activación de ILCs incluye la activación de receptores tipo Toll (TLRs). Se ha determinado la capacidad de activar ILCs *in vitro* con diversos ligandos de TLR en modelos murinos. Es el caso de ILC2 e ILC3 con ligandos del TLR2 en conjunto a IL-2 o IL-23, dan como resultado la producción de IL-5/IL-13 e IL-17/IL-22

respectivamente.^{10,28,26,29} Los ligandos del TLR3 han demostrado ser capaces de activar a las ILC1, dando como resultado la producción de IFN- γ .³⁰ En células LTI se ha determinado la expresión de: TLR1, 2, 5, 6, 7 y 9 lo que sugiere que estas células pueden responder directamente contra microorganismos.²⁹

4.4.1 Citocinas y factores transcripcionales.

Dentro del grupo 1 de ILCs, las células NK co-expresan los FT T-bet y Eomes, siendo dependientes de Eomes para su desarrollo; mientras que las ILC1 dependen de la expresión de T-bet y GATA-3.¹¹ Ambos subconjuntos dependen la IL-12 e IL-18 para su desarrollo y activación, dando como respuesta la producción de IFN- γ . Sin embargo, las ILC1 presentes en hígado e intestino de ratón también son capaces de expresar IL-2, GM-CSF, TNF- α y CCL3.^{26,31}

Existen pocos estudios sobre el efecto transcripcional de la IL-12 en las ILC1, sin embargo se han propuesto mecanismos utilizando linfocitos Th1 como modelo. La IL-12, secretada por células presentadoras de antígeno profesionales, señala a través de STAT-4 y su importancia en la diferenciación a Th1 se ha demostrado en ratones deficientes de STAT-4, los cuales presentan una deficiente respuesta Th1 con disminución de la producción de IFN- γ . STAT-4 activa la expresión de genes específicos de Th1, incluyendo *Ifng*, *Il12rb2* y *Tbx21* que codifica a T-bet, el cual induce la producción de IFN- γ , así la pérdida de la expresión de T-bet se correlaciona con la disminución de la expresión de IFN- γ .¹⁶

Para el desarrollo del grupo 2 de ILCs, es necesaria alta expresión de ROR α , GATA-3 y la presencia de IL-25, IL-33 y linfopoyetina estromal

tímica (TSLP).¹¹ Las ILC2, tienen la capacidad de producir: IL-4 (en humano, las ILC2 de ratón no son capaces de producirla²), IL-5, IL-9 e IL-13 (descritas en ratón²),²² las cuales están asociadas a reacciones alérgicas y respuesta inmune contra parásitos.²⁶ Además, con la producción de IL-5 e IL-13 pueden promover el reclutamiento de eosinófilos a tejido adiposo.³² Se ha observado un efecto sinérgico entre IL-33, IL-7 y Notch para inducir el desarrollo de ILC2.²⁶

Las IL-25, IL-33 y TSLP son liberados durante daño tisular provocado por patógenos y promueven la respuesta tipo 2. TSLP señala a través de STAT-5, la cual induce la producción de IL-13 e IL-5 en mayor proporción y en menor proporción IL-4, IL-9 y GM-CSF.²⁶

Se han identificado poblaciones ILC2 en SP humana, intestino y pulmón, así como en pólipos nasales inflamados de pacientes con rinosinusitis alérgica. El papel que desarrollan las ILC2 en la inflamación de piel y que factores regulan su función y homeostasis, no se han evaluado.³³

Respecto a las ILCs del grupo 3, se sabe que su desarrollo depende de ROR γ t²⁶ y son capaces de producir IL-17 e IL-22² en respuesta al estímulo del receptor de IL-23 (IL-23R) en humano; sin embargo, la activación por NKp44 en ILC3 NCR⁺ desencadena la producción de TNF.^{26,28}

La activación del IL-23R induce la señalización de la vía JAK-STAT, para activar STAT-3, el cual es esencial para la modulación de ROR γ t¹⁶ y la producción de IL-17 e IL-22.²⁶

La producción de IL-22 restringe a las bacterias comensales y evita la diseminación sistémica e inflamación de tejidos. Además de propiciar el mantenimiento de la barrera epitelial, la IL-22 puede inducir factores

antimicrobianos como RegIII β y RegIII γ que restringen el contacto celular de bacterias comensales-epiteliales.²⁶

En humano, los tres subconjuntos de ILC3 presentes en amígdala, lámina propia y placas de Peyer, son capaces de reconocer proteínas de origen fúngico por la presencia de TLR2 y producir IL-17 mediado por ROR γ t, asociando a estas células con un papel anti-fúngico.²⁹ En humanos, se cree que la IL-17 se exagera en enfermedades autoinmunes y se ha implicado en reclutamiento de neutrófilos, dando lugar a un aumento en la inflamación.²⁶

La IL-1 β es una citocina pro-inflamatoria producida principalmente por macrófagos induciendo la supervivencia de las células T y promoviendo su diferenciación hacia un perfil Th17.²⁶ También puede activar a células del sistema inmune innato como las células dendríticas y neutrófilos, además de células no inmunes tales como células epiteliales y endoteliales.²⁶ En ratón y humano, las ILC3 expresan el receptor para IL-1 β , que al ser activado, induce supervivencia y proliferación de ILC3. Además IL-1 β puede sinergizar con IL-23 para mejorar la producción de IL-17 e IL-22 ya que IL-1 β incrementa la expresión de IL-23R.²⁶

4.5 Generalidades del AhR.

El estudio de la interacción entre los FT descritos para cada subgrupo de ILCs es reciente; el caso del receptor Aril hidrocarburos (AhR) que inicialmente se utilizó como un criterio de clasificación poblacional; actualmente se busca determinar su función en el sistema inmune. El estudio de este receptor se inició en el área de toxicología, por lo que se definió originalmente como un receptor de 2,3,7,8- tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), miembro prototipo de las dioxinas y el más estudiado. Posteriormente se identificaron más moléculas que también se unen al AhR, incluyendo los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).³⁴ En ratones adultos, se ha observado alta expresión del AhR en pulmones, niveles moderados en hígado, timo, placenta, cerebro, corazón y bazo, y bajos niveles en músculo esquelético.³⁵

El AhR es un FT citosólico ligando dependiente, que en su forma inactiva se encuentra asociado a dos proteínas chaperonas HSP90 (Proteína de choque térmico 90), una molécula chaperona p23 y la proteína XAP2 (proteína X asociada al virus de hepatitis B2). El AhR transloca del citoplasma al núcleo de una forma ligando-dependiente, ya que el AhR requiere de la unión con su ligando para poder llegar al núcleo mediado por señales de localización nuclear (NLS). Una vez dentro del núcleo, se genera una heterodimerización con una segunda proteína denominada translocador nuclear del AhR (ARNT) o factor inducible por hipoxia 1 β (HIF-1 β),³⁶ disociando el complejo HSP90-XAP2-p23. La formación de este heterodímero AhR-ARNT se une a elementos reguladores denominados XREs (elementos de respuesta a xenobiótico) situados en regiones promotoras de genes diana codificantes para enzimas implicadas en detoxificación, como los miembros de la súper familia de citocromos P450 Cyp1A1, Cyp1A2, Cyp1B1.^{37, 38, 39, 40}

La regulación de la expresión del AhR esta mediada por dos vías: (Figura 3). 1) La vía del proteasoma, en la cual se da una rápida degradación del AhR tras su activación. Después de ejercer su acción transcripcional, el AhR es translocado del núcleo al citoplasma mediante señales de exporte nuclear (NES) que son reconocidas por la proteína cromosómica de mantenimiento región 1 (CRM1), un receptor nuclear que se encarga de exportar el AhR al citoplasma para su degradación tras su ubiquitinación.⁴¹ 2) la retroalimentación negativa por el represor del AhR (AhRR) el cual tiene la capacidad de unirse al ARNT y así reprimir la actividad transcripcional de AhR.^{42, 43}

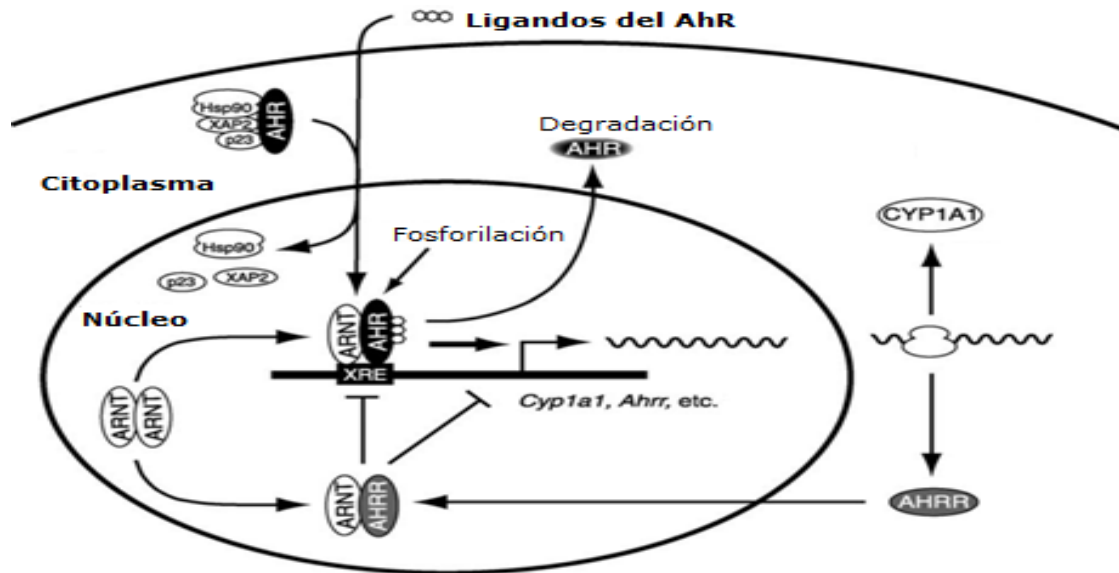


Figura 3. Mecanismo de activación transcripcional y regulación de la expresión del AhR. Posterior a la activación del receptor de Aril hidrocarburos (AhR), se forma el heterodímero AhR-ARNT, el cual se une a XRE situado en regiones promotoras de genes diana como el represor del AhR (*Ahrr*). En este punto la expresión del AhR se puede mediar por la competencia de AhR y AhRR por ARNT o por la degradación del AhR por la vía del proteasoma. Receptor de Aril hidrocarburo (AhR), represor del AhR (AhRR), translocador nuclear del AhR (ARNT). Modificado de Mimura, J. & Fujii-Kuriyama, Y. (2003)⁴³

El efecto que tiene la ausencia del AhR dentro del sistema inmune se ha evaluado en modelos murinos *knockout* AhR^{-/-}, en donde se observaron defectos hematopoyéticos como la disminución de linfocitos en bazo y nódulos linfáticos,⁴⁴ hematopoyesis extramedular en hígado y esplenomegalia. En este sentido, los ratones AhR^{-/-} son más susceptibles a infecciones.⁴²

Diversos estudios apoyan la idea de que el AhR juega un papel en la inmunidad por su potencial de regular la expresión de diversos genes involucrados en proliferación, ciclo celular, apoptosis y FT que repercuten en la actividad celular.⁴³ En el contexto de respuesta inmune adaptativa, los ligandos endógenos del AhR (Por ejemplo la quinurenina, 6-formilindol[3,2-b]carbazol (FICZ), bilirrubina, 7-cetocolesterol, cantaxantina)⁴⁵ inducen la diferenciación de los linfocitos T a Th17/Th22.

En específico, el AhR presenta una alta afinidad de unión al ligando FICZ, el cual se ha relacionado con un efecto anti-inflamatorio en intestino. La activación del AhR por este ligando, regula la expresión de IL-22 e inhibe la inflamación del tracto gastrointestinal.⁴⁶

Adicionalmente, en respuesta a ligandos exógenos (Por ejemplo el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-diosina (TCDD), bifenilo7,12-dimetilbenzo [a] antraceno (DMBA), metilcolantreno, Benzo[a]pireno, Glucosinolatos, Flavonoides, Indolcarbinol)⁴⁵ el AhR funge como un sensor de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs), estimulando la producción de citocromo P450 para la metabolización de dichos ligandos lo que se ha relacionado con la disminución de procesos tumorales.³⁴

4.5.1 Función del AhR en ILCs.

Pese a las similitudes entre las células Th17 e ILC3 en la producción de citocinas y FT expresados, las ILC3 no son simplemente un equivalente de la población de células Th17 que carecen de TCR. Existen claras diferencias entre estos dos tipos de células en términos de regulación transcripcional. La IL-6 puede inducir en Th17 *in vitro* e *in vivo*, la regulación de la expresión del AhR en células T, a través de una vía dependiente del FT transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT-3).⁴⁷

Estudios en el genoma de células Th17 de ratón, detectaron la unión de STAT-3 al promotor del gen *Ahr*, lo que sugiere que STAT-3 controla directamente la transcripción del AhR.⁴⁸ Sin embargo, la ablación genética de STAT-3 en células RORγt⁺ no tiene efecto sobre la expresión del AhR ni sobre el desarrollo de las ILC3.⁴⁷ Por el contrario, Id2 regula la expresión del AhR en ILC3 de ratón. Estudios en ratones knockout para el FT Id2 determinaron una disminución en la expresión del AhR en ILC3. Se ha demostrado que la proteína E2A, interactúa con el AhR y suprime la unión del AhR al locus *I/22*, interfiriendo con el complejo RORγt-AhR. Estos datos son consistentes con los niveles reducidos de IL-22 producidos por ILC3 deficientes en Id2 en los que se incrementa la actividad transcripcional de la proteína E2A.⁴⁷

En ratones knockout para el FT AhR las ILC3 no se encuentran en órganos como bazo y pulmones^{8,49}; sin embargo, las placas de Peyer se formaron normalmente en ausencia del AhR, concluyendo que las LTi son independientes del AhR.⁵⁰

A pesar de que el AhR no es necesario para la inducción de la expresión de RORγt, puede ser un factor estabilizador de RORγt en ILC3.⁴⁹

Se ha reportado la influencia del AhR en la homeostasis de ROR γ t en las poblaciones de ILCs. ⁵⁰ Los genes involucrados en el mantenimiento de ILC ROR γ t⁺ que AhR controla son:

- Kit (CD117): Kit se encuentra directamente bajo el control transcripcional del AhR. La activación del AhR en presencia de ligandos, en ILC ROR γ t⁺ purificadas, condujo al incremento de la expresión de Kit *in vitro*.⁴⁹ Se ha determinado que XRE se encuentra en el promotor de Kit tanto en humano como en ratón.⁵¹

- *Bcl2* y *Bcl2l1*: ILCs ROR γ t⁺ de ratones adultos mostraron ser más propensas a la apoptosis en ausencia del AhR. La expresión de los genes anti-apoptóticos *Bcl2* y *Bcl2l1* se redujo en ILC ROR γ t⁺ AhR^{-/-}. No está claro si el AhR regula directamente la expresión de *Bcl2* y *Bcl2l1* o si esto es más bien un efecto indirecto causado por la privación de la señalización de Kit o Notch.⁴⁹

4.6 Interacción de factores transcripcionales (plasticidad de ILCs).

Las ILCs tienen una gran capacidad plástica, es decir, pueden cambiar su fenotipo y función dependiendo del microambiente en el que se encuentren.⁶

Estudios previos han demostrado que la exposición prolongada de citocinas de tipo 1 en ILC3 c-Kit⁺ NKp44⁺ inducen cambios fenotípicos hacia ILC1, esto acompañado por la regulación negativa de RORC, la cual es inversamente proporcional a T-bet y a la producción de IFN- γ .⁵²

Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro*, que la población ILC1, puede diferenciarse a ILC3, dependiendo de las citocinas expuestas en su microambiente, en un proceso dependiente de ROR γ t. Adicionalmente, el ácido retinoico acelera la transición de ILC1 a ILC3 productoras de IL-22; siendo la fuente fisiológica de ácido retinoico, las células dendríticas CD103⁺.⁵² Sin embargo, T-bet tiene la capacidad de auto-activarse por la unión a su propio promotor¹⁶, obteniendo un perfil de citocinas ILC1/ILC3. Algunos de los blancos susceptibles de ser regulados por *AhR* son los factores de transcripción *ROR γ t* y *T-bet*, lo cual podría explicar la plasticidad descrita previamente entre subpoblaciones de ILC3 a ILC1,⁵³ en donde se ha observado un patrón mixto de co-expresión de factores transcripcionales (*ROR γ t* / *T-bet*) además de una producción mixta de citocinas: IL-17, IL-22 e IFN- γ . Algunos reportes han descrito que las ILCs son capaces de producir IFN- γ ya sea solo o en conjunto con IL-17.³ Las ILC3 NCR⁺ co-expresan T-bet²⁵ junto con ROR γ t, otorgando un perfil mixto de citocinas (ILC1/ILC3). Se ha demostrado que las células "ex-ROR γ t ILC3" provienen de ILC3 NCR⁺ que disminuyen la expresión de ROR γ t e incrementan T-bet e IFN- γ .²⁶

En humano, las ILC2 e ILC3 expuestas a la IL-12, pierden la expresión de los FT GATA3 y ROR γ t respectivamente, y adquieren características de ILC1, incluyendo la expresión de T-bet y producción de IFN- γ . Actualmente, estas células se denominan exILC2 y exILC3, respectivamente. La diferenciación es reversible al adicionar IL-4 a exILC2 e IL-23, IL-1 β a las células exILC3.⁶

Existen otros FT involucrados en la diferenciación y regulación funcional de ILCs. Es el caso del complejo RUNX (Conformado por RUNX-1, 2 y 3) los cuales son reguladores transcripcionales heterodiméricos conservados que han demostrado ser esenciales para la diferenciación de varias células de linaje hematopoyético, incluyendo células troncales hematopoyéticas, linfocitos B, células NKT y células T citotóxicas.⁵⁴ RUNX-1 puede formar complejos con ROR γ t o con T-bet, si lo hace con ROR γ t se favorece la producción de IL-17, pero si lo hace con T-bet se bloquea la formación de complejos con ROR γ t y por ende, no hay producción de IL-17.¹⁶ RUNX-2 tiene la capacidad de regular ROR γ t induciendo la expresión de IL-17, sin embargo RUNX-1 sigue siendo prioritaria para el desarrollo de Th17.⁵⁵ RUNX-3 actúa cooperativamente con T-bet para promover la expresión del gen que codifica el IFN- γ y silenciar *I/4* en células Th17.⁵⁵ Las ILCs responden a las señales de estrés derivadas de las células del estroma, mucosa y células mieloides, produciendo citocinas que modulan la respuesta inmune posterior. Por lo tanto, funcionan como traductores de señales de daño y su plasticidad proporciona una respuesta más rápida para orquestar una respuesta inmunológica.⁶ Como tal, las ILCs son blancos terapéuticos atractivos para una serie de trastornos inflamatorios en los que están implicadas, incluyendo enfermedades que afectan los pulmones (asma), intestino (enfermedad inflamatoria del intestino) y piel (dermatitis atópica, enfermedad injerto contra huésped y psoriasis).⁶

4.7 ILCs en piel (generalidades y función).

La estructura de la piel refleja la complejidad de sus funciones como una barrera de protección, mantenimiento de la temperatura corporal, sensor del medio ambiente y un papel activo del sistema inmunológico. Las células que participan en la respuesta inmune en piel son: queratinocitos, células dendríticas (Langerhans), linfocitos T, melanocitos, macrófagos y mastocitos principalmente.^{27,56} El papel de las ILCs en piel, se asocia con la promoción de la homeostasis.⁴⁹ En individuos sanos y pacientes con psoriasis, se ha demostrado la expresión del antígeno leucocitario cutáneo (CLA, por sus siglas en inglés) en ILCs de SP; CLA al ser un marcador de migración a piel, sugiere que las ILCs tienen la capacidad de redistribuirse de SP a piel.⁵⁷ El CLA se ha estudiado principalmente en linfocitos T, en los que se ha observado el doble de la proporción en piel con respecto a SP y el 98% de los linfocitos T CLA⁺ que se encuentran en el cuerpo humano, residen en la piel bajo condiciones fisiológicas normales. Dichas células T CLA⁺ tienen la capacidad de migrar a piel bajo procesos de adhesión y mecanismos quimiotácticos. Los linfocitos CLA⁺ circulantes son capaces de atravesar el endotelio y penetrar de manera específica a la piel, uniéndose a la selectina E expresada en células endoteliales de los vasos sanguíneos.^{27, 56,58} El papel de las ILCs en enfermedades y en la homeostasis de tejidos aún sigue en estudio. Se han hecho estudios en piel humana de individuos sanos y de pacientes con psoriasis, la cual es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel caracterizada por lesiones escamosas resultantes de la hiperproliferación de la epidermis e infiltrado inflamatorio prominente; se ha demostrado una proporción sustancial de IL-17 e IL-22 en piel y SP. En pacientes con psoriasis, aumenta la frecuencia de ILC3 NKp44⁺ tanto en SP como en piel, en comparación con individuos sanos o pacientes con dermatitis atópica.⁵⁷

4.7.1 Subpoblaciones de ILCs en piel.

Dependiendo del grupo de ILCs implicado, la interacción funcional compleja de ILCs con otras poblaciones de leucocitos puede resultar en inflamación o en la regulación negativa de eventos inflamatorios. Además, las ILCs desempeñan un papel importante en la reparación de tejidos. La mayoría de los datos disponibles actualmente sobre las ILCs en piel, son en sistemas murinos. Estos indican la existencia de poblaciones de ILCs en piel sana y sugieren una participación de ILC2 (modulando la función de mastocitos por la producción de IL-13⁵⁹) e ILC3 (mediando efectos protectores actuando sobre células epiteliales, induciendo proliferación por la producción de IL-22⁶⁰) en modelos de dermatitis atópica y psoriasis, respectivamente.^{61,62}

Análisis en piel humana de individuos sanos, han determinado que la mitad de las ILCs dermales pertenecen a las ILC1. Las ILC3 que expresan AhR/ ROR γ t representan el segundo subgrupo más prominente en piel humana.⁶¹ Cuando se compararon las muestras de individuos sanos contra muestras de pacientes con lesiones cutáneas, se encontró un aumento de ILCs en dermatitis atópica y psoriasis. En dermatitis atópica, se determinó la presencia de ILC2 y un mayor incremento de ILC3. En piel de pacientes con psoriasis, por el contrario, se ha observado una expansión de ILC1 e ILC3⁶¹.

Las ILC2, se han clasificado como reguladoras clave de la homeostasis inmune y metabólica del tejido adiposo visceral³². Se han identificado grupos de ILC2 residentes de piel humana y de ratón, los cuales son críticos para el desarrollo de inflamación. En contraste con ILC2 aisladas de intestino y pulmones, que están reguladas por IL-33 e IL-25, las ILC2 residentes de piel son independientes de estas citocinas y dependientes de TSLP.³³

4.7.2 **Función del AhR en ILCs en piel.**

Los tejidos que están expuestos a los estímulos ambientales externos, tales como el intestino, pulmones y piel, son el medio que se enriquece tanto en las células que expresan el AhR como en sus ligandos.⁴⁷

La expresión del AhR en piel tiene funciones fisiológicas muy importante como son: la regulación de la pigmentación en piel, fotocarcinogénesis e inflamación.⁶³

La actividad funcional de las ILCs ROR γ t⁺, está bajo el control de señales ambientales; sin embargo, se desconocen los sensores moleculares para tales señales. El AhR se ha descrito como un regulador maestro para el mantenimiento postnatal de ILCs ROR γ t⁺ de intestino y piel.⁴⁹

4.8 **Antecedentes directos al trabajo.**

Nuestro grupo de trabajo ha logrado identificar una población de ILCs en SP y piel de donadores sanos, que cumple con los criterios de identificación descritos previamente y además expresa CD123⁺ y una expresión baja de CD127 (Figura 4. A y C), siendo la IL-3 esencial para su mantenimiento e identidad⁶⁴. De esta manera se han estudiado dos poblaciones principales de ILCs en SP y piel de donadores sanos identificadas como 1) Lin⁻ CD123⁺ y 2) Lin⁻ CD127⁺ las cuales se han analizado como se muestra en la Figura 4. Adicionalmente se muestra la expresión de marcadores típicos de ILCs (CD90 y CD132) en cada una de las poblaciones analizadas.

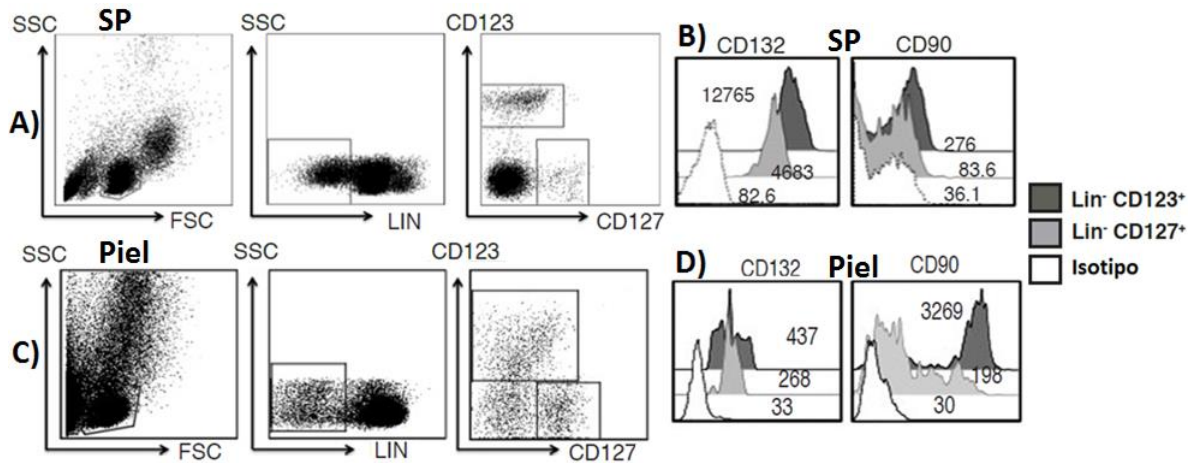


Figura 4. Identificación de poblaciones de ILCs en SP y piel de donadores sanos. Análisis de la región linfoide, exclusión de células linaje positivas (CD3, CD14, CD19, CD94, HLA-DR) y la identificación de células Lin⁻: Lin⁻ CD123⁺ CD127^{baja} y Lin⁻ CD127⁺ en SP A) y piel C). Valores representativos de medianas de fluorescencia de CD132 y CD90: Lin⁻ CD123⁺ (Negro), Lin⁻ CD127⁺ (Gris) e Isotipo (Punteado) de SP B) y piel D). Modificado de Mora-Velandia Luz, Castro-Escamilla Octavio, González Méndez Andrés, *et al.* (2017)⁶⁴

4.8.1 Clasificación de las ILCs de SP y piel.

Adicionalmente se determinó el fenotipo de ambas poblaciones descritas en SP y piel utilizando los marcadores CD161, c-Kit, CRTH2 y NKp44. Las células Lin⁻ CD123⁺ en SP mostraron un fenotipo ILC2 (CD161^{bajo}, c-Kit⁺ y CRTH2⁺) y una menor proporción de ILC1 (CRTH2⁻, c-Kit⁻) e ILC3 (CRTH2⁻, c-Kit⁺, NKp44⁻) como se muestra en la Figura 5A. Dentro de las células Lin⁻ CD127⁺, se indentificaron las 3 subpoblaciones de ILCs⁶⁴, como se muestra en la Figura 5B. Realizando el mismo procedimiento en muestras de dermis de donadores sanos, las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺ demostraron un fenotipo mixto de ILC1, ILC2 e ILC3 (NKp44⁺ y NKp44⁻) (Figura 5. C y D).⁶⁵ Posteriormente se comparó la producción de citocinas de ambas poblaciones en SP y piel.

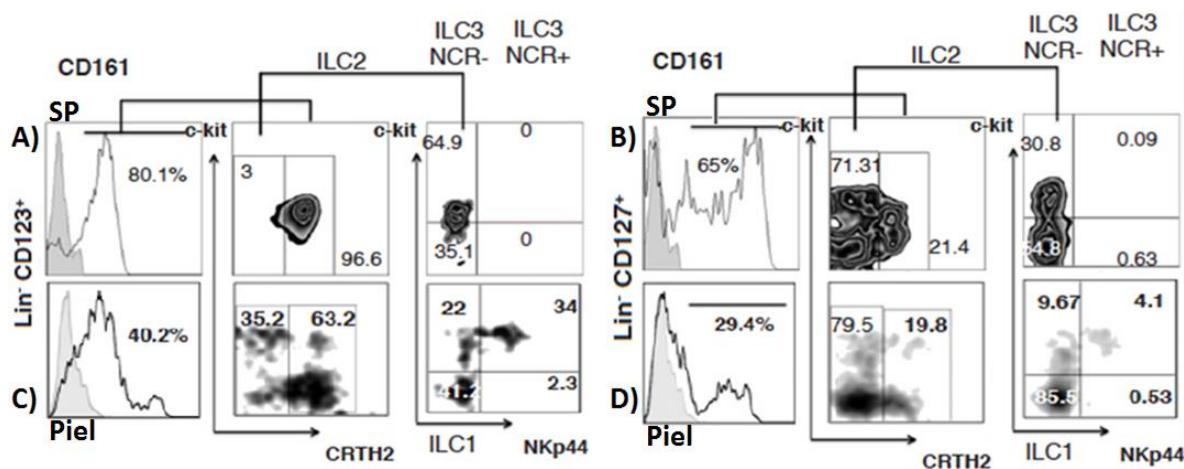


Figura 5. Las ILCs Lin⁻ CD123⁺ de SP tienen un fenotipo ILC2 mientras que en piel tienen un fenotipo mixto. Clasificación de las subpoblaciones de ILCs a partir de PBMCs A) y B) y dermis de donadores sanos C) y D). Regiones en: Células CD161⁺; ILC1 (CRTH2⁻, c-Kit⁻), ILC2 (CRTH2⁺) e ILC3 (CRTH2⁻, c-Kit⁺). Subpoblaciones en A) y C) Lin⁻ CD123⁺ y subpoblaciones en Lin⁻ CD127⁺ en B) y D). Modificado de Mora-Velandia Luz, Castro-Escamilla Octavio, González Méndez Andrés, *et al.* (2017)⁶⁴

4.8.2 Expresión de citocinas.

La población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ de SP expresa $\text{IFN-}\gamma$, IL-2 e IL-4 al activarse con ionomicina/forbol-12-miristato-13-acetato (Iono/PMA) (Figura 6A); la producción de citocinas fue similar para la población $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ (Figura 6. C). No se detectó producción de IL-17 e IL-22 en $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ y solo una mínima producción de IL-22 en $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ (Figura 6. A y C). En el caso de la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ de piel, además de $\text{IFN-}\gamma$, IL-2 e IL-4, se observó la producción de IL-17 e IL-22 (Figura 6. B). En el caso de $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ la producción de IL-2 aumento y la de $\text{IFN-}\gamma$, IL-17 e IL-22 fue menor con respecto a la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ y prácticamente nula de IL-4 (Figura 6. D). Al evaluar el receptor de IL-23 (IL-23R) en ambas poblaciones de SP y piel (Figura 6. E y F respectivamente) se determinó que la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ posee una mayor expresión de este receptor lo cual sugiere que es más susceptible a la activación mediada por IL-23 descrita para ILC3.

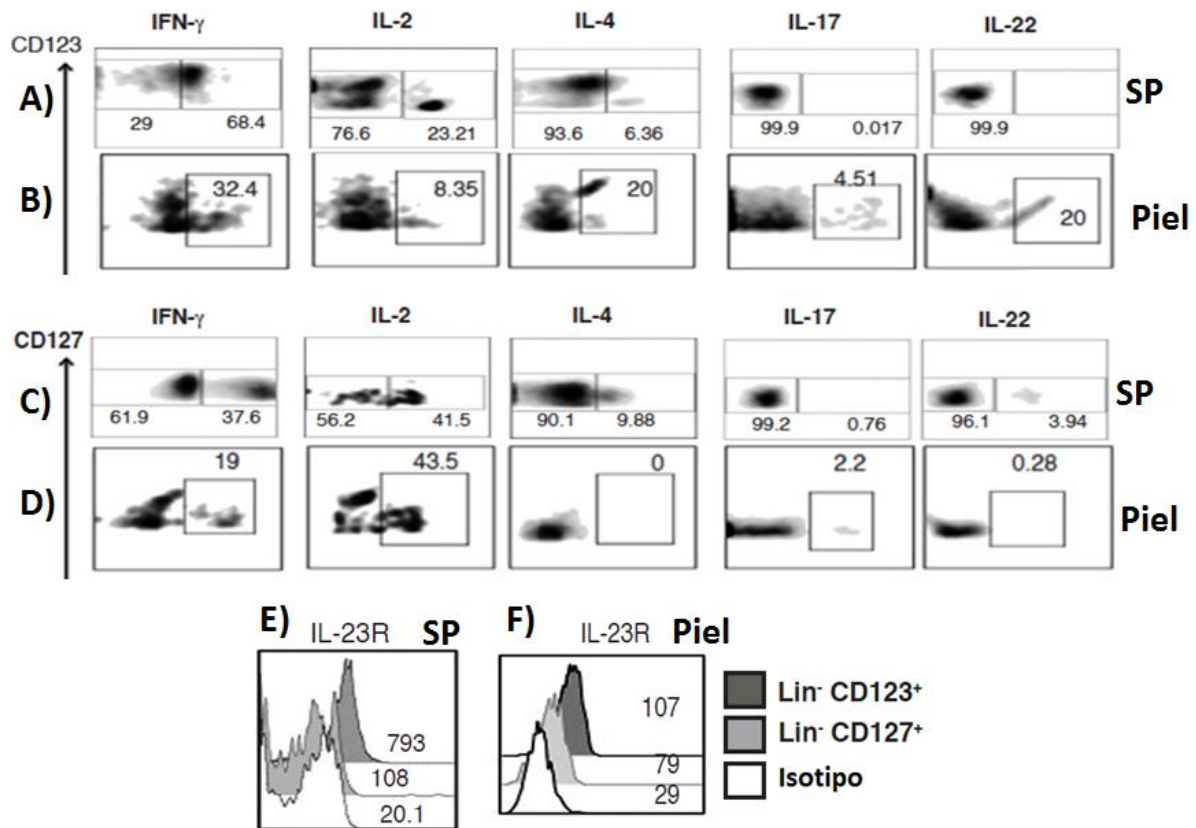


Figura 6. Las ILCs Lin⁻ CD123⁺ expresan una limitada cantidad de citocinas del perfil tipo Th. Los porcentajes de células positivas y negativas que expresan IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-17 e IL-22; en presencia de Iono/PMA. Poblaciones A) y B) Lin⁻ CD123⁺ de SP y piel respectivamente, C) y D) Lin⁻ CD127⁺ de SP y Piel respectivamente. Histogramas con mediana de fluorescencia de IL-23R en población Lin⁻ CD123⁺ (negro), Lin⁻ CD127⁺ (gris) e Isotipo (blanco) de E) SP y F) piel. Mora-Velandia Luz, Castro-Escamilla Octavio, González Méndez Andrés, *et al.* (2017)⁶⁴

5. **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

- ¿Cuál es la expresión del AhR en las ILCs Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺ de SP y piel?
- ¿Cuál es el efecto de la activación de ILCs de SP con un ligando endógeno del AhR?
- ¿Cómo se ve afectada la expresión de otros factores transcripcionales como T-bet, ROR γ t y RUNX-1 por la activación del AhR?

6. **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la expresión del AhR en ILCs de SP y evaluar el efecto de su activación con un ligando endógeno.

7. **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la expresión del AhR en ILCs de SP y piel mediante citometría de flujo.
- Evaluar la producción de citocinas (IL-17 e IL-22) después de la activación mediada por un ligando endógeno del AhR (FICZ: 6-formilindol[3,2-b]carbazol).
- Evaluar la expresión de: ROR γ t, T-bet y RUNX-1 en ILCs de SP en estado basal y después de activación.

8. **HIPÓTESIS**

- Las poblaciones de ILCs de SP: Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺ al expresar el AhR, serán susceptibles de ser activadas por el ligando endógeno FICZ lo cual conllevará a la producción de IL-17 e IL-22 la cual es regulada por los factores T-bet, ROR γ t y RUNX-1.

9. **MATERIALES Y MÉTODOS**

9.1 **Muestra de sangre periférica.**

Los concentrados leucocitarios (buffy coats), a partir de los cuales se colectaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), se obtuvieron del Banco de Sangre del Hospital Infantil de México Federico Gómez provenientes de donadores sanos.

9.2 **Obtención y conteo de PBMCs.**

Las muestras de sangre se diluyeron 1:1 con buffer salino de fosfatos (PBS), posteriormente se sometieron a un gradiente de densidad de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Lymphoprep, Fresenius Kabi Norge AS), con el objetivo de colectar la fase de células mononucleares. Las células fueron sometidas a tres lavados con la finalidad de eliminar el ficoll adyacente y plaquetas. Finalmente se resuspendió el botón celular en un volumen conocido. Las PBMCs obtenidas, se contaron en cámara de Neubauer, utilizando azul tripano como colorante vital, el cual permite diferenciar células vivas y muertas.

9.3 **Obtención de células de piel sana.**

Las muestras de piel se colocaron en medio RPMI-1640 (Biowest, USA) suplementado (Para 1L: Suero fetal bovino (HyClone ThermoFisher Scientific, USA) 10%, aminoácidos no esenciales (Biowest, USA) 1%, HEPES (Biowest, USA) 1%, piruvato de sodio (GIBCO ThermoFisher Scientific, USA) 1%, L-glutamina (Biowest, USA) 1%, β -mercaptoetanol (SIGMA ALDRICH, USA) 0.01%, ciprofloxacino (HyClone ThermoFisher Scientific, USA) 1%, penicilina-estreptomicina (10,000 unidades/mL & 10,000 μ g/mL HyClone ThermoFisher Scientific, USA) 1% y dispasa (Grade II protease, Roche) durante toda la noche para separar mecánicamente dermis y epidermis. La dermis se colocó en caja de Petri con medio RPMI suplementado y se incubaron por 7 días a 37°C y 5%

de CO₂. Al finalizar la incubación, se colectaron las células y se contaron en cámara de Neubauer, utilizando azul tripano como colorante vital, para posteriormente evaluar sus factores de transcripción mediante tinciones intracelulares.

9.3.1 **Declaración de ética.**

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua, número 112/2016, y por el Comité de Ética para la Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (número del comité: 3601). El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios detallados en la Declaración de Helsinki. Todos los participantes firmaron un formulario de consentimiento informado.

9.4 **Ensayos de activación celular.**

Una vez determinado el número total de PBMCs, se cultivaron durante 18 horas (37°C /5% CO₂) con medio RPMI suplementado en presencia de los diferentes estímulos: el ligando endógeno del AhR 6-formilindol[3,2-b]carbazol (FICZ) (Bioselec, USA), dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, México), Iono/PMA (500X) (eBioscience, USA) y los cocteles de activación de ILC1 (IL-3 (10ng/mL), IL-7 (50ng/mL), IL-12 (50ng/mL), IL-15 (50ng/mL); (PeproTech, USA) y coctel de activación de ILC3 (IL-3 (10ng/mL), IL-7 (50ng/mL), IL-2 (30ng/mL), IL-1β (50ng/mL), IL-23 (50ng/mL); (PeproTech, USA); finalizado el tiempo de incubación se cosecharon las células para posteriormente evaluar la expresión de citocinas y factores transcripcionales mediante tinción intracelular.

9.5 **Tinciones de inmunofluorescencia (tinción de superficie e intracelulares).**

Las PBMCs se tiñeron utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales: α-CD3 Clona: HIT3a, α-CD14 Clona: HCD14, α-CD19

Clona: HIB19, α -CD94 Clona: DX22, α -HLA-DR Clona: L243, todos acoplados a ficoeritrina (PE) o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Biolegend, USA) con el objetivo de excluir a las células linaje positivas. Los marcadores utilizados para la identificación de las poblaciones de ILCs incluyen a: α -CD123 (Biotina), Clona: 6H6 y α -CD127 Fluorocromo: (Brilliant Violet 421), Clona: A019D5; Biolegend, USA y α -CLA (Biotina), Clona: HECA-452, BD Biosciences, USA. Las células en suspensión fueron teñidas durante 15 min/4°C y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% durante 15 min/4°C. Para las pruebas de viabilidad, se realiza una tinción extra con Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific, USA) 5 minutos antes de fijar las células. Para la determinación de los FT (α -T-bet Fluorocromo: PerCP-Cy5.5, Clona: 4B10, Biolegend, USA, α -ROR γ t Fluorocromo: APC, Clona: AFKJS-9, eBioscience-Affymetrix, USA, α -RUNX-1 Fluorocromo: PE, Clona: RXDMC, eBioscience-Affymetrix, USA y α -AhR Fluorocromos: PE y APC, Clona: FF3399, eBioscience-Affymetrix, USA) y citocinas intracelulares (α -IL-2 Fluorocromo: APC, Clona: 5344.111, BD Biosciences, USA, α -IL-4 Fluorocromo: PerCP-Cy5.5, Clona: MP4-25D2, Biolegend USA., α -IL-17 Fluorocromo: AlexaFluor 488, Clona: eBio64DEC17, eBioscience-Affymetrix, USA y α -IL-22 Fluorocromo: eFluor660, Clona: 22URTI, (Biolegend, USA), posterior a la tinción de superficie, se realizó la permeabilización y fijación utilizando cytofix/cytoperm (BD Biosciences, USA) 20 min/4°C y realizando la posterior incubación con los anticuerpos correspondientes durante 30 min/temperatura ambiente. Las muestras se conservaron a 4°C para su posterior adquisición en el citómetro de flujo FACS CANTO (BD Biosciences, USA). Los datos generados fueron analizados con el programa Flowjo Treestar versión 7.6.3.

10. RESULTADOS

10.1 Identificación de ILCs en SP.

Se evaluó la tinción para identificar las ILCs en SP humana por citometría de flujo, utilizando un parámetro de exclusión de células linaje positivas para los marcadores: CD3, CD14, CD19, CD94 y HLA-DR, analizando las células linaje negativo (Lin^-) (Figura 7 C). El siguiente parámetro fue utilizando la expresión del marcador CD127 para determinar la población de ILCs "Clásicas" ($\text{Lin}^- \text{CD127}^+ \text{CD123}^-$) y la expresión del marcador CD123 para identificar la población de ILCs-like ($\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{baja}}$). En la Figura 7, se muestran los parámetros de análisis e identificación de las poblaciones mencionadas.

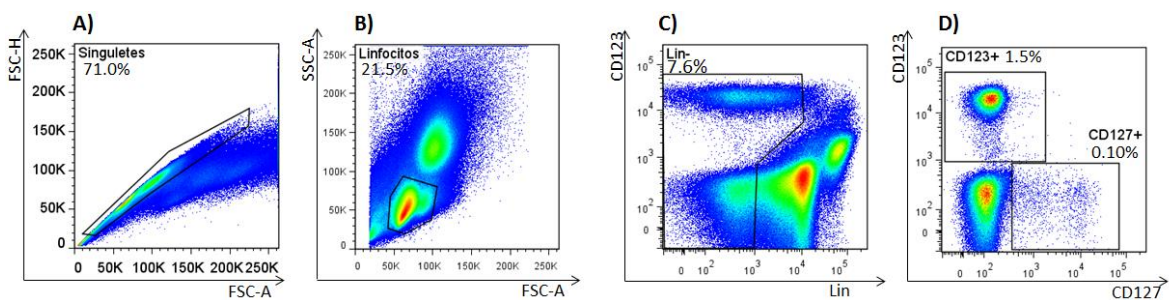


Figura 7. Identificación de dos poblaciones linaje negativas: ILCs $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ e ILCs $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ en SP. En A)-C) se muestra la estrategia de análisis realizada para la identificación de dos poblaciones identificadas en D) como: $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{CD127}^{\text{bajas}}$ y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+ \text{CD123}^-$. Lin-: CD3^- , CD14^- , CD19^- , CD94^- y HLA-DR^- .

10.2 Expresión de citocinas en ILCs de SP.

Se analizó la expresión de citocinas en cada una de las poblaciones $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ (Figura 8 A) y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ (Figura 8 B) después de la estimulación con Iono/PMA. El resultado fue la expresión de: $\text{IFN}\gamma$, IL-2 e IL-4 en ambas poblaciones. De manera interesante observamos que no fueron capaces de producir IL-17 e IL-22.

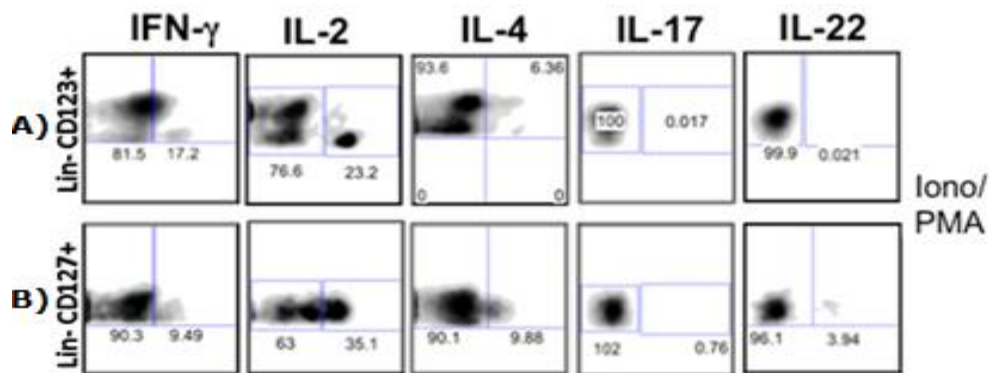


Figura 8. Las poblaciones de ILCs en SP activadas con Iono/PMA, no son capaces de producir IL-17 ni IL-22. Se determinó que ambas poblaciones, A) $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ y B) $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$, tienen la capacidad de producir diversas citocinas como: $\text{IFN}\gamma$, IL-2, IL-4; no así, IL-17 e IL-22 bajo estimulación con Iono/PMA durante 6h.

10.3 Co-expresión de FT en ILCs de SP.

Por otra parte para determinar el fenotipo completo de las poblaciones de SP se evaluó la expresión basal del: AhR, ROR γ t, RUNX-1 y T-bet (Figura 9) y se compararon con otra población capaz de expresar dichos FT (linfocitos T). Tanto los linfocitos T como las ILCs son capaces de expresar el AhR, ROR γ t, RUNX-1 y T-bet. Sin embargo, las ILCs tienen una mayor expresión de ROR γ t (en el caso de ambas poblaciones de ILCs) y de T-bet (en el caso de la población Lin⁻ CD123⁺).

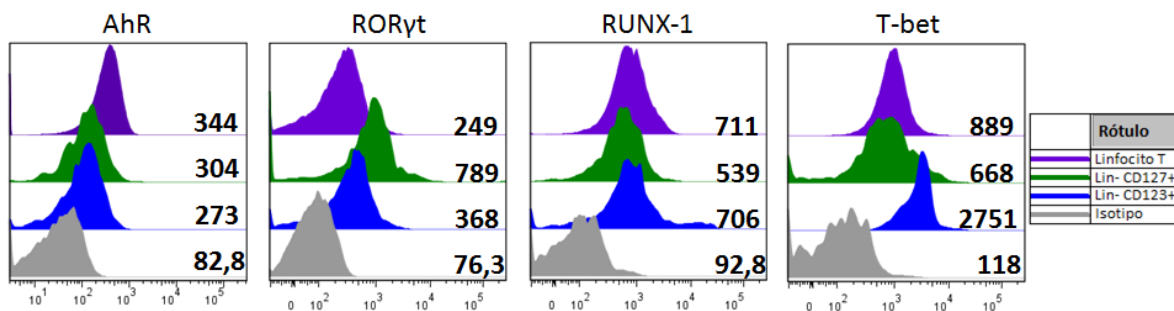


Figura 9. Las poblaciones de ILCs en SP co-expresan: AhR, ROR γ t, RUNX-1 y T-bet. Se determinó la co-expresión de: AhR, ROR γ t, RUNX-1 y T-bet de forma basal en ambas poblaciones de ILCs y linfocitos T. Los histogramas muestran las medianas de fluorescencia de cada FT. Patrones de color: Linfocito T (morado), Lin⁻ CD127⁺ (verde), Lin⁻ CD123⁺ (azul), Isotipo (Gris).

10.4 Pruebas de viabilidad con un ligando endógeno (FICZ) del AhR.

Para evaluar el efecto de la activación mediada por el AhR sobre las poblaciones en estudio, se eligió un ligando endógeno por su participación en la diferenciación de Th17/Th22⁴⁵. El 6-formilindol[3,2-b]carbazol (FICZ) además de ser un compuesto no carcinogénico, posee una gran afinidad al AhR comparable con la dioxina.⁴⁹ El FICZ es un fotoproducto del triptófano,⁶⁶ el cual se puede encontrar tanto en SP como en piel.⁴⁹ Se utilizó la concentración de FICZ 3,0 μ M reportada previamente por un grupo de trabajo para estimular linfocitos Th17 e ILCs humanas provenientes de ganglios.⁶⁷ Para determinar si la viabilidad celular es afectada por el tratamiento con el disolvente del ligando dimetilsulfóxido (DMSO) y en conjunto con el ligando, se utilizaron concentraciones de 0.6 μ M, 3.0 μ M y 10 μ M. Se realizó una tinción nuclear con Hoechst 33342 para evaluar si el efecto de la estimulación con FICZ sobre las poblaciones en estudio durante una incubación de 18 horas. La viabilidad celular no se vio afectada bajo ninguna concentración (Figura10).

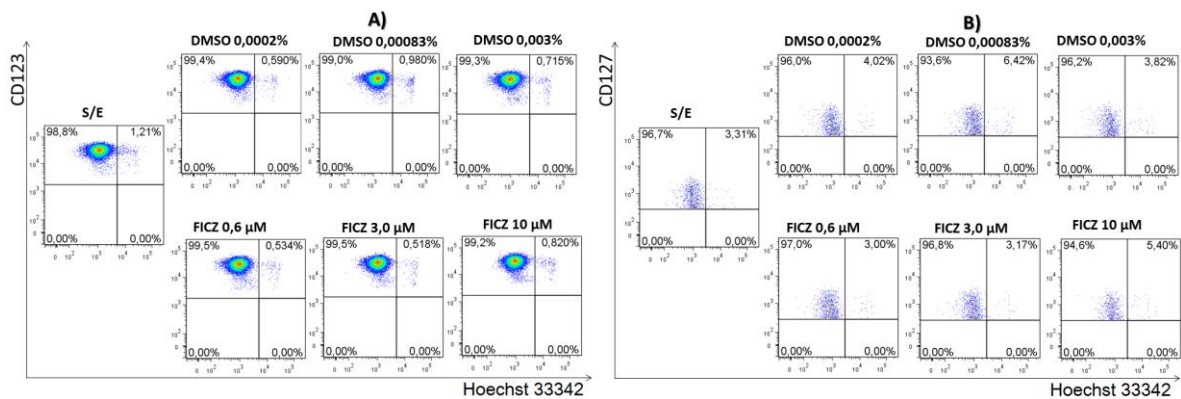


Figura 10. La viabilidad celular se mantiene durante la activación con FICZ. La concentración del DMSO corresponde a la concentración de FICZ empleado. Se determinó la viabilidad celular mediante tinción por Hoechst 33342 en la población A) Lin- CD123⁺ y B) Lin- CD127⁺ a 18 horas.

10.5 Evaluación de IL-17 e IL-22 en ILCs de SP en presencia de FICZ y coctel de activación de ILC3.

Se evaluó la capacidad de ambas poblaciones, de producir IL-17 e IL-22 después de la estimulación con el ligando endógeno del AhR y el coctel de activación de ILC3 (Figura 11). A pesar de utilizar las condiciones descritas en la literatura para la producción de dichas citocinas, no se observó la expresión de IL-17 (Figura 11 A) ni IL-22 (Figura 11 B).

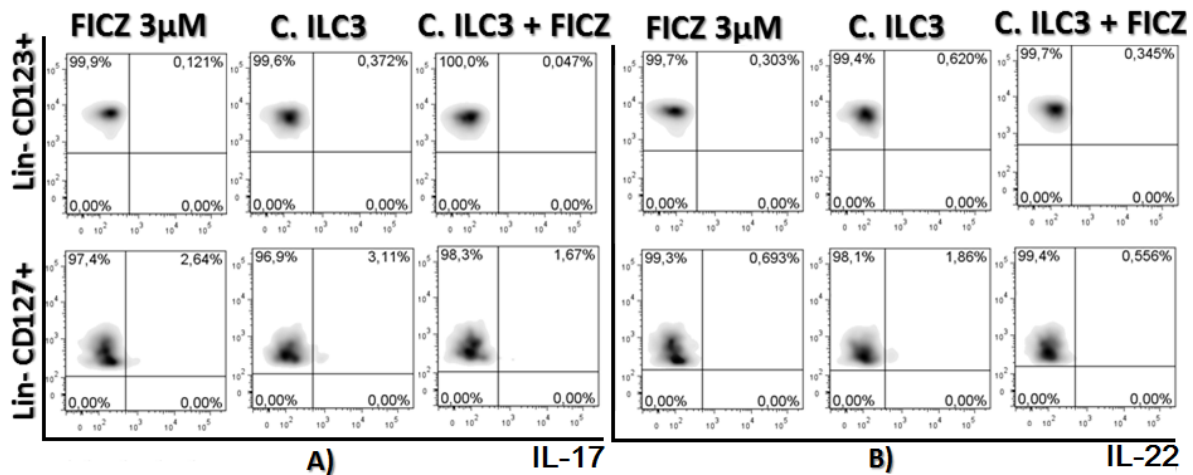


Figura 11. ILCs de SP no son capaces de producir IL-17 ni IL-22 tras la estimulación con FICZ. Determinación de A) IL-17 y B) IL-22 en poblaciones Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺ bajo 18h de estímulo con FICZ 3µM, coctel de activación de ILC3 (C. ILC3) y C. ILC3 + FICZ 3µM. C. ILC3 (IL-1β, IL-2, IL-3, IL-7 e IL-23).

10.6 Evaluación de IFN- γ en ILCs de SP en presencia de FICZ y coctel de activación de ILC1.

Se evaluó el efecto del coctel de activación de ILC1, ya que en estudios previos (Figura 8) se determinó que las ILCs de SP son capaces de producir IFN- γ , en específico la población Lin⁻ CD123⁺ por su alta expresión de T-bet. Del mismo modo, se evaluó si la activación del AhR, sería capaz de modificar la producción de IFN- γ .

Se determinó la producción de IFN- γ (Figura 12) en presencia del coctel de activación de ILC1 (IL-3, IL-7, IL-12 e IL-15) y FICZ. La activación del AhR con FICZ no afectó la producción de IFN- γ en ambas poblaciones.

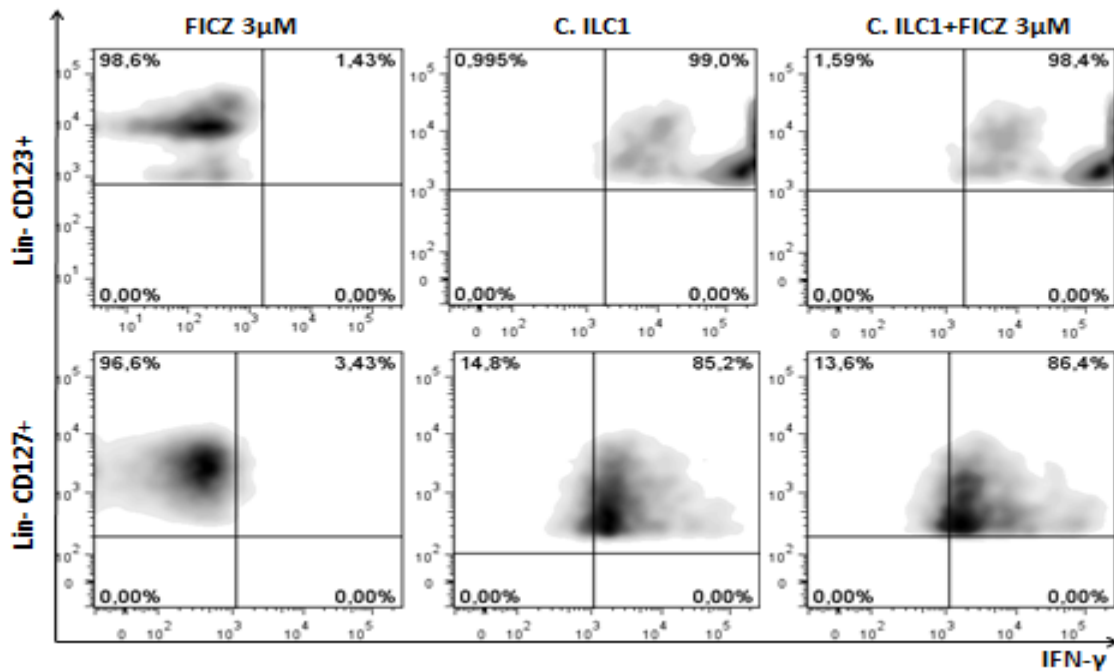


Figura 12. Producción de IFN- γ en ILCs de SP en presencia de un coctel de activación de ILC1. Evaluación de IFN- γ en poblaciones Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺ en presencia del FICZ, C. ILC1 (IL-3, IL-7, IL-12, IL-15) y C. ILC1 + FICZ tras 18h de estímulo.

10.7 Efecto de los cocteles de activación de ILC1/ILC3+FICZ sobre el fenotipo de las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺ de SP.

Al realizar las tinciones de superficie fue posible identificar los tres subgrupos de ILCs. El análisis se realizó de la siguiente forma: una vez identificadas las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ (Figura 13) y Lin⁻ CD127⁺ (Figura 14) en SP, se analizó por histogramas, la expresión de CD161 (marcador que expresan los tres subgrupos). A partir de la expresión de CD161, se determinó la expresión de c-Kit (CD117) y CRTH2, para determinar las poblaciones ILC3 CD161⁺ c-Kit⁺ CRTH2⁻ e ILC2 CD161⁺ c-Kit⁻ CRTH2⁺. Para subdividir las poblaciones de ILC3 por NCR, se analizó la región de c-Kit y el marcador NKp44, para determinar las poblaciones ILC3 CD161⁺ c-Kit⁺ CRTH2⁻ NKp44⁺ (NCR⁺), ILC3 CD161⁺ c-Kit⁺ CRTH2⁻ NKp44⁻ (NCR⁻) e ILC1 CD161⁺ c-Kit⁻ CRTH2⁻ NKp44⁻.

El fenotipo de las ILCs dentro de la población Lin⁻ CD123⁺ es homogéneo, ya que comprende mayoritariamente células ILC2 (CRTH2⁺) (Figura 13 A) y en la población Lin⁻ CD127⁺ es más heterogéneo, siendo la subpoblación de ILC1 las que se encuentran en mayor proporción (Figura 14 A).

De manera interesante se observa que el fenotipo de la población Lin⁻ CD123⁺ cambia a ILC1 después de ser activadas ya sea por el coctel de activación de ILC1 (Figura 13 B) o Iono/PMA (Figura 13 D). Por otra parte, en el caso del coctel de activación de ILC3+FICZ (Figura 13 C) aumentó ligeramente la población de ILC3 NCR⁻.

En la población Lin⁻ CD127⁺ bajo condiciones de estimulación con el coctel de activación de ILC1 (Figura 14 B), coctel de activación de ILC3+FICZ (Figura 14 C) e Iono/PMA (Figura 14 D), se observaron cambios en el fenotipo aumentando la subpoblación ILC1.

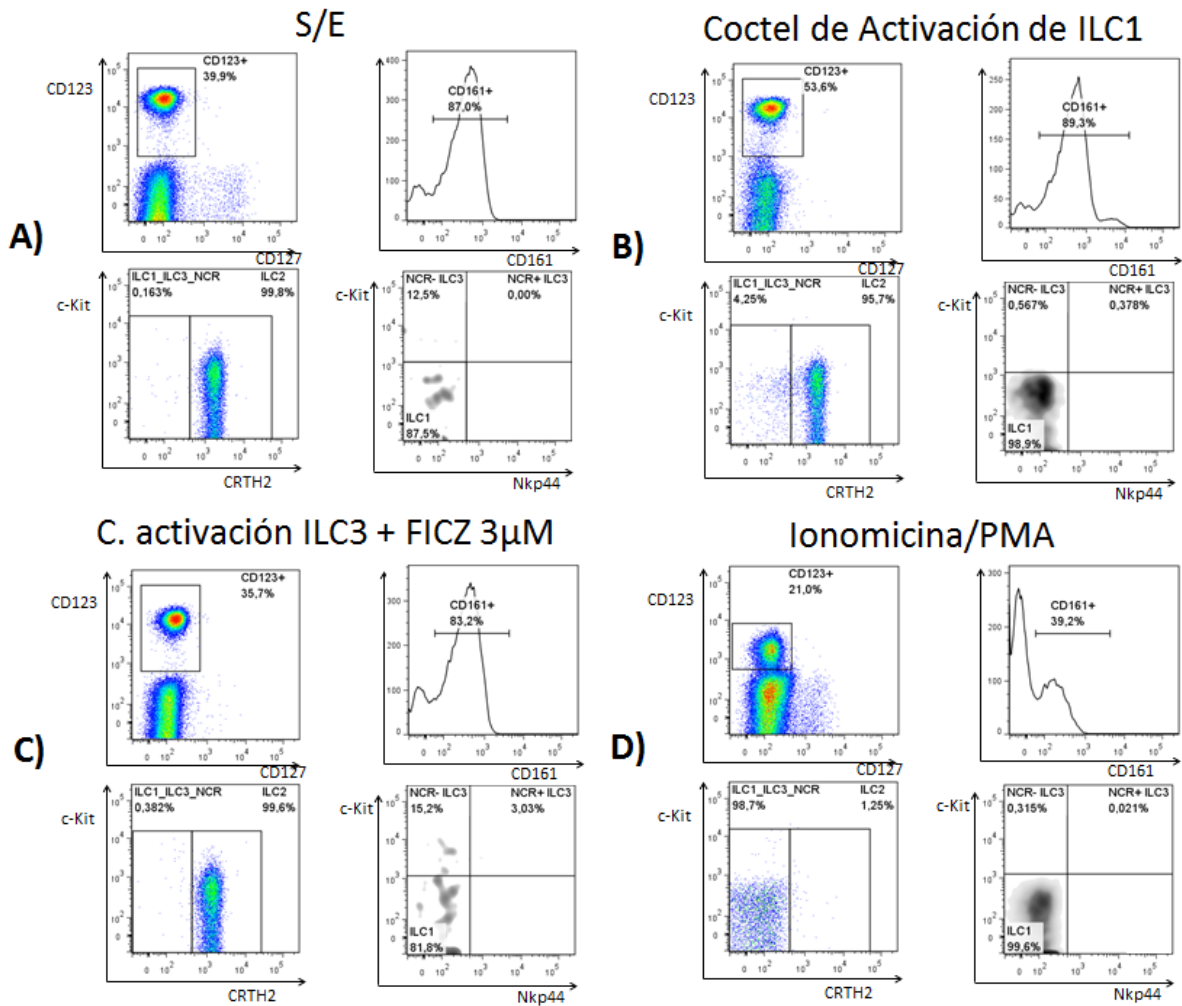


Figura 13. La población Lin⁻ CD123⁺ de SP modifica su fenotipo de ILC2 a ILC1 tras la estimulación con el coctel de activación de ILC1 e Iono/PMA. A) Sin estímulo (S/E), B) Coctel de activación de ILC1, C) Coctel de activación de ILC3+FICZ 3 μ M y D) Iono/PMA. Periodos de incubación: A), B) y C) a 18h y D) a 6h.

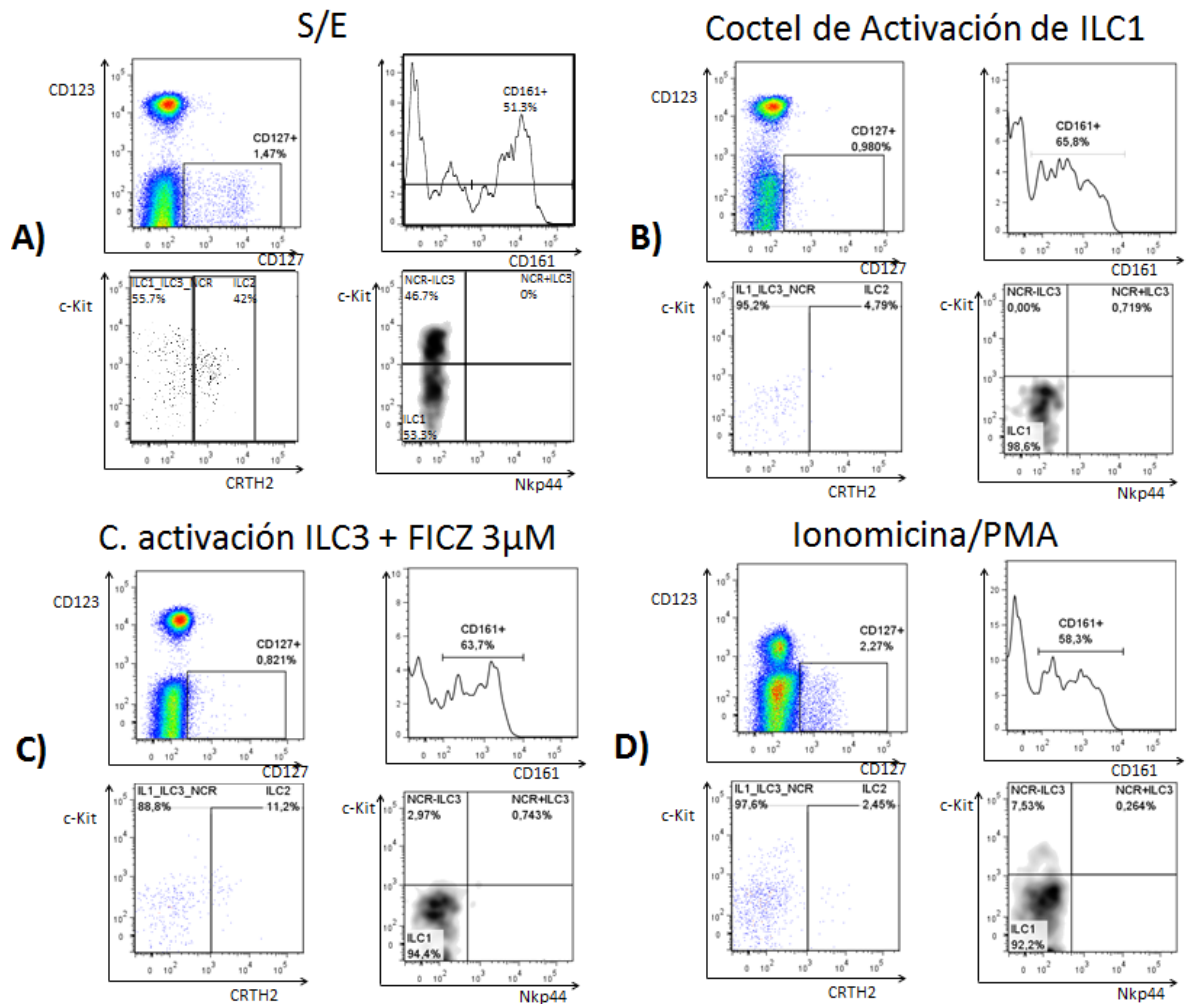


Figura 14. Población $Lin^- CD127^+$ de SP modifica sus fenotipos bajo condiciones de estimulación. A) Sin estímulo (S/E), B) Coctel de activación de ILC1, C) Coctel de activación de ILC3+FICZ 3µM y D) Iono/PMA. Periodos de incubación: A), B) y C) a 18h y D) a 6h.

10.8 Regulación Transcripcional tras la activación de ILCs de SP con un coctel de activación de ILC3 y un ligando endógeno del AhR.

A pesar de que la estimulación con FICZ y el coctel de activación de ILC3 no indujo cambios fenotípicos, ni producción de IL-17 e IL-22 en las poblaciones de ILCs de SP, nos preguntamos si es capaz de regular la expresión de otros factores de transcripción relacionados con el fenotipo de ILC3. En la Figura 15 A se muestra que ambas poblaciones disminuyen la expresión del AhR al estimular con el FICZ. La población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ (azul) incrementó la expresión del AhR con el coctel de activación de ILC3 y nuevamente disminuye al estimular con el coctel en conjunto con el FICZ; la expresión del AhR en la población $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ (verde) permaneció constante en ambas condiciones.

En la Figura 15B se evaluó la expresión de T-bet, el cual se observa una disminución en ambas poblaciones bajo el estímulo del coctel de activación de ILC3. En el caso del FICZ solo y en conjunto del coctel de activación de ILC3, T-bet mantiene su expresión.

En la Figura 15 C y D se muestra el aumento en la expresión de ROR γ t y RUNX-1 respectivamente, bajo la condición del coctel de activación de ILC3 más FICZ en ambas poblaciones, sin embargo la población con una mayor proporción de ROR γ t fue $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ y para RUNX-1 fue $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$.

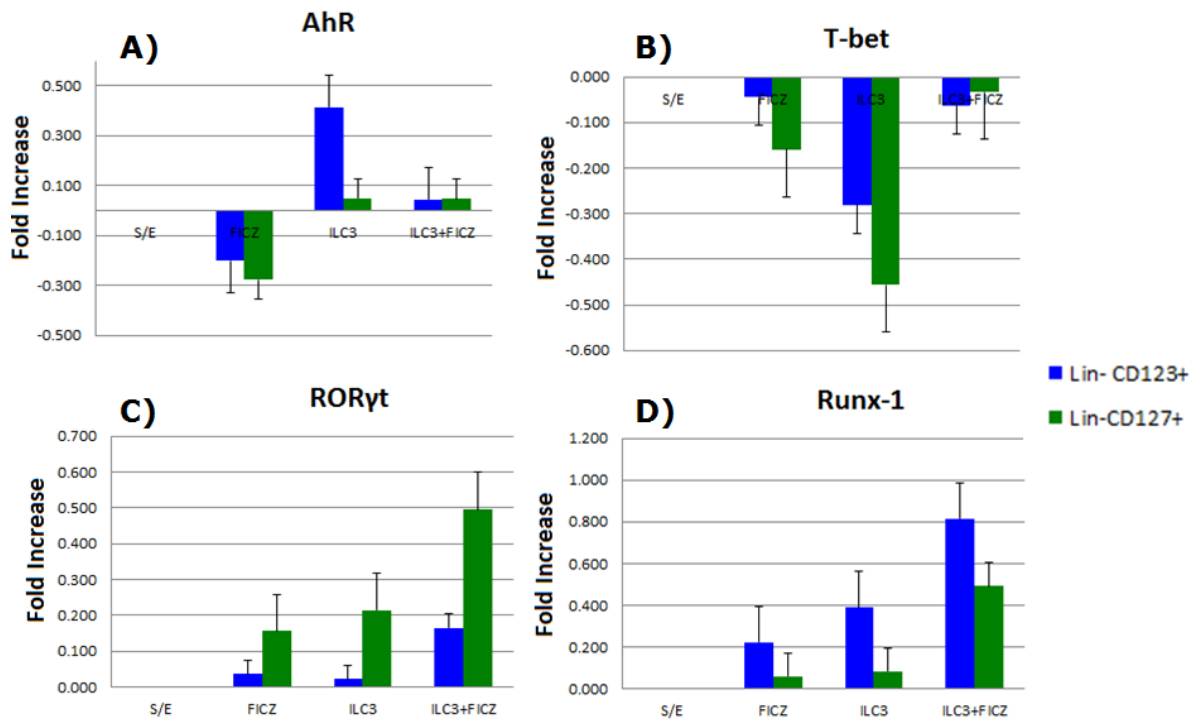


Figura 15. Aumento en la expresión (Fold Increase) de RORγt y RUNX-1 en respuesta a C. ILC3 y C. ILC3 + FICZ. De acuerdo a los valores de medianas de fluorescencia determinadas por citometría de flujo, se calculó el aumento de la expresión con el logaritmo base 2 de cada factor de transcripción con respecto al sin estímulo (S/E) en cada una de las poblaciones. A) AhR, B) T-bet, C) RORγt y D) RUNX-1. Lin⁻ CD123⁺ (azul) y Lin⁻ CD127⁺ (verde). N=4

10.9 Expresión de CLA en ILCs de SP.

Ya que la piel es uno de los órganos con mayor contacto con ligandos del AhR, se evaluó la capacidad de tropismo a piel de las poblaciones $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ de SP a piel. Al determinar la expresión del antígeno leucocitario cutáneo (CLA) en ILCs de SP, se obtuvo una mayor expresión en la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ (Figura 16 A) con respecto a la población $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ (Figura 16 B).

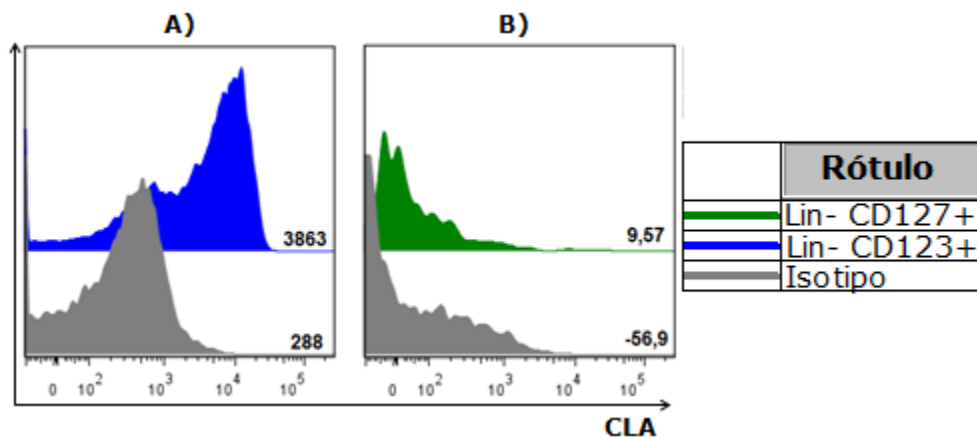


Figura 16. Expresión de CLA en la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$. Se muestra en los histogramas la expresión de CLA en una mayor proporción en la población A) $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ (Azul) que en B) $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ (verde).

10.10 Co-expresión de FT en ILCs de SP y Piel.

De acuerdo a nuestros antecedentes, se lograron identificar en dermis de individuos sanos, dos poblaciones equivalentes a $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ de SP. Al igual que en SP (Figura 17 A), en piel (Figura 17 B) se determinó que ambas poblaciones presentan la co-expresión de los factores de transcripción AhR, ROR γ t, RUNX-1 y T-bet.

Comparada con la expresión de FT de SP, en piel se observa una disminución en la expresión de T-bet en ambas poblaciones. En el caso de la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ la disminución en la expresión de RUNX-1 y el aumento de la expresión del AhR y ROR γ t, sugieren que esta población es capaz de producir IL-17 e IL-22 (Figura 17.)

Por otro lado la población $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ mantuvo la expresión de RUNX-1 y disminuyó la expresión del AhR y ROR γ t, siendo menos susceptibles a expresar IL-17 e IL-22. (Figura 17.)

En la figura 6 se corrobora que la población $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ tiene una mejor expresión de IL-17 e IL-22 a comparación de la población $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$.

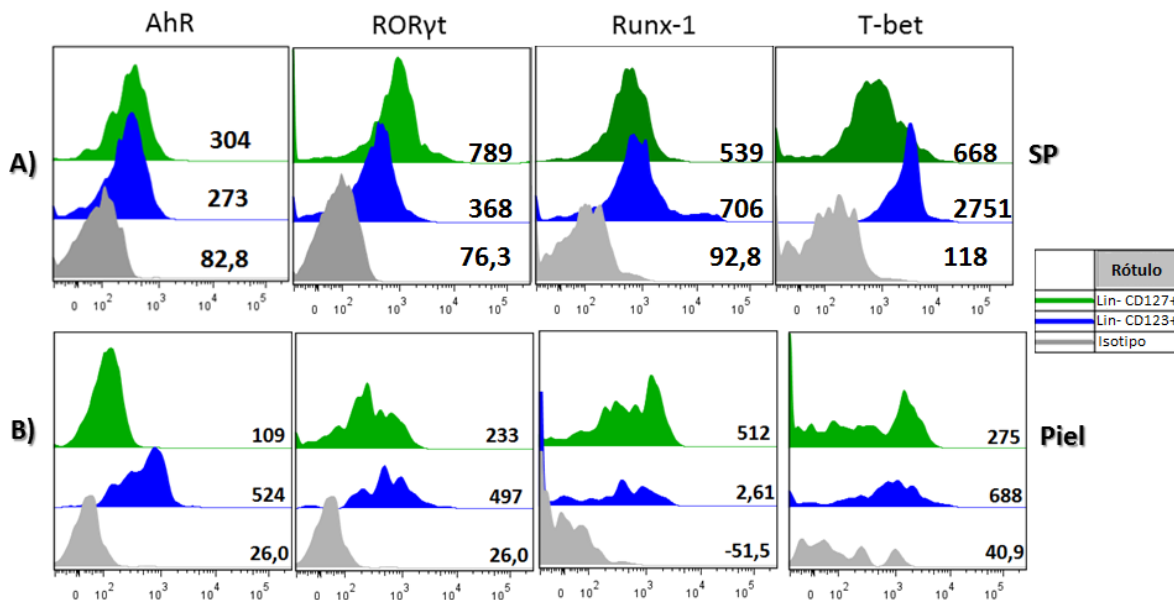


Figura 17. Co-expresión de FT en ILC de SP y Piel. Expresión de los FT: AhR, ROR γ t, RUNX-1 y T-bet en A) SP y B) Piel humana. Poblaciones $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ (Azul) y $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ (Verde).

11. **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

En las dos poblaciones de ILCs denominadas Lin⁻ CD127⁺ (clásicas) e ILC-Like (Lin⁻ CD123⁺ CD127^{baja}) en SP y dermis de donadores sanos (Figura 7) en las cuales se determinó la expresión de los FT relacionados con las funciones de las ILCs (Figura 9) tales como AhR, T-bet, ROR γ t y RUNX-1. La expresión del AhR e IL23R (Figura 6) en conjunto con ROR γ t, en ambas poblaciones, sugiere que pudieran tener la capacidad de producir IL-17 e IL-22 en SP.

Se determinó un perfil mixto de citocinas observado con el estímulo de Iono/PMA (Figura 8). La producción de IFN- γ se asocia a ILC1 e IL-4 a ILC2. La ausencia de IL-17 e IL-22 por parte del grupo 3 de ILCs nos indica la falta de estímulos necesarios para su activación, consecuente a una posible falta de maduración o diferenciación celular.

La activación con el coctel de ILC1 dio lugar a la producción de IFN- γ , sin embargo el coctel de activación de ILC3 no indujo la producción de IL-17 e IL-22. Lo cual en conjunto con el fenotipo observado después la activación con el cóctel de ILC1 y la alta expresión de T-bet sugiere que las poblaciones de ILCs en SP tienen un perfil "pre-programado" de diferenciación tipo ILC1.

La capacidad de ambas poblaciones para responder al coctel de activación de ILC1 (Figura 12), sugiere:

- En la población Lin⁻ CD123⁺ sugiere que a pesar de que en condiciones basales el fenotipo predominante corresponde a las ILC2, después de la activación con el cóctel de ILC1 es posible observar la expresión de IFN- γ y el cambio en la expresión de marcadores fenotípicos, lo cual puede explicarse a la plasticidad que ha sido previamente descrita en estas células.

- Pese a la heterogeneidad de la población $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$, incluyendo una proporción de ILC3 NCR^- (Figura 5 B y 14 A), el coctel de activación de ILC1 promovió cambios fenotípicos, disminuyendo la población ILC3 NCR^- (Figura 14 A) y aumentando la proporción de la población con fenotipo de ILC1 (Figura 14 B).
- La alta expresión de T-bet, es capaz de dirigir la respuesta de ambas poblaciones en SP bajo condiciones de estímulo al perfil de tipo ILC1 .

A pesar de esta “pre-programación” hacia el fenotipo de ILC1 observado en ambas poblaciones, la co-expresión de los FT AhR y $\text{ROR}\gamma\text{t}$, el receptor de IL-23 y la previa producción de IL-17 e IL-22 detectada en las células de piel, sugerían fuertemente que hay mecanismos involucrados en la regulación de la diferenciación y función de estas células.

Existen estudios previos en donde se ha demostrado la existencia de una estrecha relación entre el AhR / $\text{ROR}\gamma\text{t}$ y su acción sinérgica en el desarrollo del perfil ILC3^{68} , por lo cual decidimos analizar el efecto de un ligando endógeno de alta afinidad (FICZ) del AhR como posible factor de activación y diferenciación de ILC3 , en conjunto con el coctel de ILC3 .

Interesantemente como se muestra en la figura 13 C, se observa un mayor porcentaje de células $\text{Lin}^- \text{CD123}^+$ caracterizadas con el fenotipo de ILC3 comparado con el control sin estimular, lo que sugiere una participación del AhR al ser activado con su ligando en conjunto con el coctel de activación de ILC3 , promoviendo el aumento de $\text{ROR}\gamma\text{t}$ y RUNX-1 (Figura 15 C y D), siendo RUNX-1 el de mayor proporción. Los resultados sugieren que estas células son susceptibles de una posterior

diferenciación y de que poseen capacidades plásticas por las cuales pueden adquirir características de ILC3. Hasta el momento se sabe poco sobre la plasticidad de ILCs.⁶⁹ Se ha propuesto que la plasticidad depende del microambiente de citocinas pro-ILC1, 2 y 3 las cuales ayudan a regular la expresión de los factores transcripcionales característicos de cada población celular, además de otros factores ambientales como DAMPs/PAMPs que promuevan la diferenciación de las ILCs para promover la resolución o en algunos casos la exacerbación de cierta patología.^{20,52}

En el caso de la población $\text{Lin}^- \text{CD127}^+$ el efecto transcripcional del AhR al ser activado con FICZ en conjunto con el coctel de activación de ILC3, fue un aumento en la expresión de ROR γ t y RUNX-1 (Figura 15 C y D), siendo ROR γ t el de mayor proporción, denotando la capacidad de esta población a responder al perfil de ILC3.

Se ha descrito que el FT RUNX-1 participa en la diferenciación a Th17 mediante la inducción de la expresión de ROR γ t, uniéndose y actuando conjuntamente durante la transcripción de *I17*. Las proteínas RUNX pueden regular la transcripción de una manera dependiente de unión con otro FT para formar complejos co-activadores o co-represores; ej. RUNX-1 actúa cooperativamente con T-bet para promover la expresión del gen que codifica el IFN- γ y silenciar *I4* en células Th17. En ausencia de ROR γ t, RUNX-1 no ejerce efecto sobre *I17*. Se propone una compleja interacción entre ROR γ t y RUNX-1 en la regulación de la respuesta inmune de Th17.¹⁶ Los resultados obtenidos con las dos poblaciones de SP en las cuales se observa el incremento en la expresión de RUNX-1 en respuesta al coctel de activación de ILC3 y FICZ sugieren que la co-expresión de ambos factores es un paso previo de activación para la diferenciación hacia el perfil tipo ILC3.

Por otra parte la expresión del FT T-bet disminuyó en ambas poblaciones en presencia de FICZ y el coctel de activación de ILC3 (Figura 15 B), sin embargo al estimular con el coctel de activación de ILC3 más FICZ, T-bet mantiene su expresión. Se ha descrito que T-bet tiene la capacidad de bloquear el desarrollo de Th17 por la inhibición de *Rorc*. T-bet interacciona con RUNX-1, bloqueando su función,⁷⁰ lo que sugiere que la interacción T-bet-RUNX-1 tiene un efecto dominante con respecto a la interacción RUNX-1-ROR γ t. Es por esto que en las poblaciones de SP en donde fue posible observar la expresión de IFN- γ , no se determinó la expresión de IL-17 e IL-22. Adicionalmente en ratones deficientes de T-bet, se ha observado un aumento en la expresión de IL-17, indicando su potencial inhibitorio en la diferenciación a Th17.¹⁶ Esta evidencia en conjunto con los resultados obtenidos, indican que existe un mecanismo de regulación negativa para la producción de IL-17 e IL-22 el cual involucra a su vez a T-bet y RUNX-1, ya que a pesar de la expresión observada de IL-23R, AhR y ROR γ t en las poblaciones analizadas, no se detectaron dichas citocinas. La alta expresión de T-bet en conjunto con RUNX-1, sugiere que la interacción de estos factores es un posible mecanismo de regulación negativa para la producción de IL-17 e IL-22 en las poblaciones de SP analizadas.

Finalmente de acuerdo a los antecedentes previos en donde se observó que las poblaciones en estudio se encuentran en piel sana, donde son capaces de producir IL-17/IL-22, se analizó la expresión de CLA para determinar el potencial que tienen de migrar a dicho tejido. De acuerdo a los datos presentados, la población Lin⁻ CD123⁺ tiene una mayor capacidad de tropismo que la población Lin⁻ CD127⁺ debido a la alta expresión de CLA (Figura 16).

De manera interesante en las muestras de piel analizadas en donde se ha detectado la producción tanto de IL-17 como de IL-22, la expresión basal con respecto a SP en el caso de T-bet, es menor y para el AhR y ROR γ t, es mayor en la población Lin $^{-}$ CD123 $^{+}$. Dichos resultados sugieren que la producción de IL-17 e IL-22 está mediada por la disminución de T-bet y el aumento en la expresión de ROR γ t y AhR a diferencia de la población Lin $^{-}$ CD127 $^{+}$ pese a la disminución en la expresión de T-bet, también disminuyó la expresión del AhR y ROR γ t, repercutiendo en la producción de IL-17 e IL-22 (Figura 6).

Cabe mencionar que la exposición de ligandos es mayor en piel que en SP, siendo FICZ el ligando endógeno más abundante al ser un fotoproducto del triptófano a partir de la luz UV⁴⁹, esto sugiere que el mecanismo de activación mediada por ligandos de AhR es más eficiente en piel.

En resumen, se logró identificar la expresión del AhR en poblaciones de ILCs "clásicas" (Lin $^{-}$ CD127 $^{+}$) y en una nueva población "like" (Lin $^{-}$ CD123 $^{+}$) de SP humana. En condiciones basales, las células Lin $^{-}$ CD123 $^{+}$ tienen un fenotipo ILC2, mientras que las células Lin $^{-}$ CD127 $^{+}$ poseen un fenotipo mixto de las tres subpoblaciones de ILCs. Sin embargo, bajo condiciones de estímulo (Iono/PMA o coctel de activación de ILC1), tienen la capacidad de modular su respuesta a un perfil de tipo 1, modificando sus fenotipos a ILC1 y produciendo IFN- γ ; por lo cual estas células son potenciales blancos terapéuticos, por ejemplo en la inmunoterapia contra melanoma, siendo el IFN- γ el principal inhibidor del crecimiento tumoral.⁷¹ Bajo condiciones de activación del AhR en un microambiente de citocinas que promueven la diferenciación y activación de ILC3 (coctel de activación de ILC3), la expresión de ROR γ t y RUNX-1 aumentan en ambas poblaciones, siendo en la población Lin $^{-}$ CD127 $^{+}$, mayor la proporción de ROR γ t y en Lin $^{-}$ CD123 $^{+}$, una mayor proporción

de RUNX-1. Dichos resultados en conjunto a la expresión de IL-23R y la previa producción de IL-17 e IL-22 en ILCs de piel, sugieren la existencia de mecanismos involucrados en la regulación de la diferenciación y función de estas células dada la ausencia de IL-17 e IL-22 en SP, posiblemente por la dimerización de T-bet-RUNX-1, generando un efecto antagónico en su producción. Dicho mecanismo es relevante para evitar efectos autoinmunes como psoriasis o artritis reumatoide en las cuales la IL-17 se encuentra exacerbada, promoviendo un ambiente pro-inflamatorio.

12. CONCLUSIONES

- Las ILCs tanto Lin⁻ CD123⁺ como Lin⁻ CD127⁺ presentes en SP, co-expresan los factores de transcripción: AhR, ROR γ t, RUNX-1 y T-bet. La activación del AhR con FICZ más el coctel de activación de ILC3, favorecen la expresión de ROR γ t y RUNX-1. Sin embargo, no hay producción de IL-17 e IL-22 en ILCs de SP.
- Las poblaciones Lin⁻ CD123⁺ y Lin⁻ CD127⁺ al mantener una expresión constante de T-bet, tienen la capacidad de modificar su fenotipo a ILC1 y producir IFN- γ bajo condiciones de activación, además de tener un efecto de regulación negativo para la expresión de IL-17 e IL-22.
- La población Lin⁻ CD123⁺ al tener una elevada expresión de CLA, tiene la capacidad de realizar tropismo a piel. Sin embargo, es necesario realizar pruebas adicionales de migración para corroborar su potencial.
- La disminución en la expresión de T-bet y el aumento del AhR y ROR γ t en la población Lin⁻ CD123⁺ de piel, sugiere las condiciones óptimas para la producción de IL-17 e IL-22.

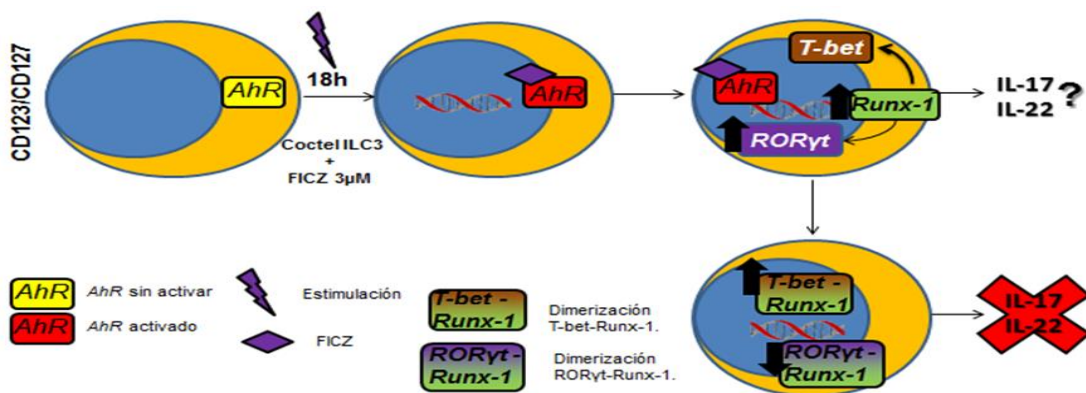


Figura 18. Regulación negativa de IL-17 e IL-22 en ILCs de SP mediado por T-bet-Runx-1. La activación del AhR por FICZ aumenta la

expresión de ROR γ t y RUNX-1, siendo RUNX-1 capaz de dimerizar con ROR γ t y T-bet. La dimerización T-bet-Runx-1 es un posible mecanismo de regulación negativa de la producción de IL-17 e IL-22 en ILCs de SP.

13. **REFERENCIAS**

1. Klose Christoph S N, Flach Melanie, Möhle Luisa, et al. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* **157**, 340–356 (2014).
2. Spits Hergen, Artis David, Colonna Marco, et al. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 145–9 (2013).
3. Bernink Jochem H, Peters Charlotte, Munneke Marius, et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat. Immunol.* **14**, 221–9 (2013).
4. Hazenberg Mette D. & Spits Hergen. Human innate lymphoid cells. *Blood* **124**, 700–709 (2014).
5. Serafini Nicolas, Vosshenrich Christian A J & Di Santo, J. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 415–28 (2015).
6. Mjösberg, Jenny & Spits, H. Human Innate Lymphoid Cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2016). doi:10.1016/j.jaci.2016.09.009
7. Murphy, K. (2009) **Immunología de Janeway**, 7ª ed. D.F., México. McGrawHill. pp: 259-262.
8. Juelke Kerstin & Romagnani, C. Differentiation of human innate lymphoid cells (ILCs). *Curr. Opin. Immunol.* **38**, 75–85 (2016).
9. Vivier Eric, van de Pavert Serge A, Cooper Max D, et al. The evolution of innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* **17**, 790 (2016).
10. Eberl Gérard, Colonna Marco, Di Santo James P, et al. Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science* (80-.). **348**, aaa6566–aaa6566 (2015).
11. Gronke Konrad, Nielsen Michael Kofoed & Diefenbach, A. Innate lymphoid cells, precursors and plasticity. *Immunol. Lett.* (2016). doi:10.1016/j.imlet.2016.07.004
12. Ishizuka Isabel E, Constantinides Michael G, Gudjonson Herman, et al. The Innate Lymphoid Cell Precursor. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 299–316 (2016).
13. Weber Brittany Nicole, Wei-Shine Chi Anthony, Chavez Alejandro, et al. A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. **476**, 63–68 (2012).
14. Cherrier M, Ohnmacht C, Cording S, et al. Development and function of intestinal innate lymphoid cells. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 277–283 (2012).
15. Xu Wei, Domingues Rita G, Di Santo James P, et al. NFIL3 orchestrates the emergence of common helper innate lymphoid cell precursors. *Cell Rep.* **10**, 2043–2054 (2015).
16. Ellmeier, W. (2014) **Transcriptional Control of Lineage Differentiation in Immune Cells**, Suiza. Springer. pp. 127, 128 y 135
17. Fahnenstich Jasmin, Nandy Andreas, Milde-Langosch Karin, et al. Promyelocytic leukaemia zinc finger protein (PLZF) is a glucocorticoid- and progesterone-induced transcription factor in human endometrial stromal cells and myometrial smooth muscle cells. *Mol. Hum. Reprod.* **9**, 611–623 (2003).
18. Mjösberg Jenny M, Trifari Sara, Crellin Natasha K, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat. Immunol.* **12**, 1055–1062 (2011).
19. Yoshifumi Yokota, Mansouri Ahmed, Mori Seiichi, et al. Development of

- peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* **397**, 702–706 (1999).
20. Montaldo Elisa, Juelke Kerstin & Romagnani, C. Group 3 innate lymphoid cells (ILC3s): Origin, differentiation, and plasticity in humans and mice. *Eur. J. Immunol.* **45**, 2171–2182 (2015).
 21. Spits, H. & Cupedo, T. Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 647–675 (2012).
 22. Vosshenrich Christian AJ & Di Santo, J. P. Developmental programming of natural killer and innate lymphoid cells. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 130–138 (2013).
 23. Eberl Gérard, Di Santo James P & Vivier, E. The brave new world of innate lymphoid cells. *Nat. Publ. Gr.* **16**, 1–5 (2015).
 24. Roan Florence, Stoklasek Thomas A, Whalen Elizabeth, et al. CD4+ Group 1 Innate Lymphoid Cells (ILC) Form a Functionally Distinct ILC Subset That Is Increased in Systemic Sclerosis. *J. Immunol.* (2016). doi:10.4049/jimmunol.1501491
 25. Klose Christoph S N & Artis, D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat. Immunol.* **17**, 765 (2016).
 26. Seillet Cyril, Belz Gabrielle T & Mielke, L. A. Complexity of cytokine network regulation of innate lymphoid cells in protective immunity. *Cytokine* **70**, 1–10 (2014).
 27. Nestle Frank O, Di Meglio Paola, Qin Jian-Zhong, et al. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 679–91 (2009).
 28. Glatzer Timor, Killig Monica, Meisig Johannes, et al. ROR γ t+ Innate Lymphoid Cells Acquire a Proinflammatory Program upon Engagement of the Activating Receptor NKp44. *Immunity* **38**, 1223–1235 (2013).
 29. Crellin Natasha K, Trifari Sara, Kaplan Charles D, et al. Regulation of cytokine secretion in human CD127+ LTI-like innate lymphoid cells by toll-like receptor 2. *Immunity* **33**, 752–764 (2010).
 30. Fuchs Anja, Vermi William, Lee Jacob S., et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of cytokine responsive interferon- γ -producing cells. *NIH Public Access* **38**, 769–781 (2013).
 31. Daussy Cécile, Faure Fabrice, Moyol Katia, et al. T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *J. Exp. Med.* **211**, 563–77 (2014).
 32. Chalubinski Maciej, Luczak Emilia, Wojdan Katarzyna, et al. Innate lymphoid cells type 2 – emerging immune regulators of obesity and atherosclerosis. *Immunol. Lett.* 7–10 (2016). doi:10.1016/j.imlet.2016.09.007
 33. Kim Brian S, Siracusa Mark C, Saenz Steven A, et al. TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *NIH Public Access* **5**, 1–26 (2013).
 34. Julliard Walker, Fechner John H & Mezrich, J. D. The aryl hydrocarbon receptor meets immunology: Friend or foe? A little of both. *Front. Immunol.* **5**, 1–6 (2014).
 35. Garrison Patricia M & Denison, M. S. Analysis of the murine AhR gene promoter. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **14**, 1–10 (2000).
 36. Chun Yang-Sook, Kim Myung-Suk & Park, J. W. Oxygen-Dependent and -Independent Regulation of HIF-1 α . *J. Korean Med Sci* **17**, 581–588 (2002).
 37. Hanieh, H. Toward understanding the role of aryl hydrocarbon receptor in the immune system: current progress and future trends. *Biomed Res Int* **2014**, 520763 (2014).
 38. Ikuta Togo, Eguchi Hidetaka, Tachibana Taro, et al. Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* **273**,

- 2895–2904 (1998).
39. Rowlands J. Craig & Gustafsson, J.-Å. Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Signal Transduction. *Crit. Rev. Toxicol.* **27**, 109–134 (1997).
 40. Berg Petra & Pongratz, I. Differential Usage of Nuclear Export Sequences Regulates Intracellular Localization of the Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 43231–43238 (2001).
 41. Davarinis Nikos A & Pollenz, R. S. Aryl Hydrocarbon Receptor Imported into the Nucleus following Ligand Binding Is Rapidly Degraded via the Cytosplasmic Proteasome following Nuclear Export. *J. Biol. Chem.* **274**, 28708–28715 (1999).
 42. Stevens Emily A, Mezrich Joshua D & Bradfield, C. A. The aryl hydrocarbon receptor: A perspective on potential roles in the immune system. *Immunology* **127**, 299–311 (2009).
 43. Mimura, J. & Fujii-Kuriyama, Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1619**, 263–268 (2003).
 44. Kiss, E. A. & Vonarbourg, C. Aryl hydrocarbon receptor: A molecular link between postnatal lymphoid follicle formation and diet. *Gut Microbes* **3**, 577–582 (2012).
 45. Bisson William, Koch Daniel, O'Donnell Edmond, et al. Modeling of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) ligand binding domain and its utility in virtual ligand screening to predict new AhR ligands. *NIH Public Access* **52**, 5635–5641 (2012).
 46. Yin Jiuhe, Sheng Baifa, Han Bin, et al. The AhR is involved in the regulation of LoVo cell proliferation through cell cycle-associated proteins. *Cell Biol. Int.* **40**, 560–568 (2016).
 47. Zhou, L. AHR Function in Lymphocytes: Emerging Concepts. *Trends Immunol.* **37**, 17–31 (2016).
 48. Durant Lydia, Watford Wendy T, Ramos Haydeé L, et al. Diverse Targets of the Transcription Factor STAT3 Contribute to T Cell Pathogenicity and Homeostasis. *NIH Public Access* **32**, 605–615 (2011).
 49. Kiss Elina A & Diefenbach, A. Role of the aryl hydrocarbon receptor in controlling maintenance and functional programs of ROR γ t⁺ innate lymphoid cells and intraepithelial lymphocytes. *Front. Immunol.* **3**, 1–11 (2012).
 50. Montaldo, E., Juelke, K. & Romagnani, C. Group 3 innate lymphoid cells (ILC3s): Origin, differentiation, and plasticity in humans and mice. *Eur. J. Immunol.* **45**, 2171–2182 (2015).
 51. Lee, J. S., Cella, M. & Colonna, M. AHR and the transcriptional regulation of type-17/22 ILC. *Front. Immunol.* **3**, 1–8 (2012).
 52. Bernink Jochem H, Krabbendam Lisette, Germar Kristine, et al. Interleukin-12 and -23 Control Plasticity Of Cd127+ Group 1 And Group 3 Innate Lymphoid Cells In The Intestinal Lamina Propria. *Immunity* **43**, 146–160 (2015).
 53. Walker Jennifer A, Barlow Jillian L & McKenzie, A. N. J. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 75–87 (2013).
 54. Tachibana Masashi, Tenno Mari, Tezuka Chieko, et al. Runx1/Cb2 Complexes Are Required for Lymphoid Tissue Inducer Cell Differentiation at Two Developmental Stages. *J. Immunol.* **186**, 1450–1457 (2011).
 55. Zhang, F., Meng, G. & Strober, W. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1297–1306 (2008).
 56. Castrillón Rivera Laura E, Palma Ramos Alejandro & Padilla Desgarenes, C. La función inmunológica de la piel. *Dermatología Rev. Mex.* **52**, 211–224 (2008).
 57. Villanova Federica, Flutter Barry, Tosi Isabella, et al. Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44+ ILC3 in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 984–991 (2014).
 58. Ferran Marta, Romeu Ester R, Rincón Catalina, et al. Circulating CLA⁺ T

- lymphocytes as peripheral cell biomarkers in T-cell-mediated skin diseases. *Exp. Dermatol.* **22**, 439–442 (2013).
59. Roediger Ben, Kyle Ryan, Ho Yip Kwok, et al. Cutaneous immuno-surveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *NIH Public Access* **14**, 564–573 (2015).
 60. Mjösberg, J., Bernink, J., Peters, C. & Spits, H. Transcriptional control of innate lymphoid cells. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1916–1923 (2012).
 61. Brügggen Marie-Charlotte, Bauer Wolfgang, Reininger Bärbel, et al. In situ mapping of innate lymphoid cells in human skin: evidence for remarkable differences between normal and inflamed skin. *J. Invest. Dermatol.* (2016). doi:10.1016/j.jid.2016.07.017
 62. Dyring-Andersen B, Geisler C, Agerbeck C, et al. Increased number and frequency of group 3 innate lymphoid cells in nonlesional psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.* **170**, 609–616 (2014).
 63. Esser Charlotte, Bargaen Imke, Weighardt Heike, et al. Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Semin. Immunopathol.* **35**, 677–691 (2013).
 64. Mora-Velandia Luz, Castro-Escamilla Octavio, González Méndez Andrés, et al. A Human Lin⁻ CD123⁺ CD127^{low} Population Endowed with ILC Features and Migratory Capabilities Contributes to Immunopathological Hallmarks of Psoriasis. *Front. Immunol.* **8**, 1–19 (2017).
 65. Mjösberg Jenny, Bernink Jochem, Golebski Korneliusz, et al. The Transcription Factor GATA3 Is Essential for the Function of Human Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity* **37**, 649–659 (2012).
 66. Öberg Mattias, Bergander Linda, Hakansson Helen, et al. Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity. *Toxicol. Sci.* **85**, 935–943 (2005).
 67. Hughes Tiffany, Briercheck Edward L, Freud Aharon G, et al. AHR prevents human IL-1R1hi ILC3 differentiation to natural killer cells. *NIH Public Access* **8**, 150–162 (2014).
 68. Ebihara Takashi, Song Christina, Ryu Stacy H, et al. Runx3 specifies lineage commitment of innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* **16**, 1–11 (2015).
 69. Artis, D. & Spits, H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* **517**, 293–301 (2015).
 70. Lazarevic Vanja, Chen Xi, Shim Jae-Hyuck, et al. T-bet represses TH17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. *Nat. Immunol.* **12**, 96–104 (2011).
 71. Kortylewski Marcin, Komyod Waraporn, Kauffmann Maria-Elisabeth, et al. Interferon- γ -Mediated Growth Regulation of Melanoma Cells: Involvement of STAT1-Dependent and STAT1-Independent Signals. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 414–422 (2004).