



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Zacatenco

Departamento de Biomedicina Molecular

**“Evaluación de la función del receptor nuclear Nur77 en
la respuesta inflamatoria de macrófagos humanos”**

Que presenta:

Q.F.B. Eduardo Patiño Martínez

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias
en la especialidad de Biomedicina Molecular

Directora de tesis:

Dra. María Carmen Sánchez Torres

México, DF.

CINVESTAV
IPN
ADQUISICION
LIBROS

Agosto 2015

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de la Dra. María Carmen Sánchez Torres, en el departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

COMITÉ TUTORIAL

Directora de tesis:
Dra. María Carmen Sánchez Torres

Asesores:

Dra. Leticia Cedillo Barrón
Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Leopoldo Santos Argumedo
Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

El Q.F.B. Eduardo Patiño Martínez realizó esta tesis de maestría con una beca otorgada por CONACYT (No. 299431)

AGRADECIMIENTOS

- Al CONACYT por el apoyo económico facilitado a través de la beca No. 299431 para el desarrollo de estudios de maestría.
 - Al CINVESTAV por la permitirme formar parte de esta institución y realizar mis estudios de maestría.
 - Al Banco de Sangre del centro Médico Nacional “La Raza” por las facilidades para la adquisición de las muestras utilizadas en el desarrollo de este trabajo.
 - A la Dra. María Carmen Sánchez por ser parte fundamental en esta etapa de mi formación con sus enseñanzas, consejos y paciencia.
 - A mis asesores: Dra. Leticia Cedillo Barrón y Dr. Leopoldo Santos Argumedo por todas las observaciones y sugerencias compartidas para mejorar este proyecto.
 - A la Dra. Norma Segovia por sus consejos y ayuda en la realización de las técnicas de laboratorio.
 - Al Dr. Luis Chávez de la UIM en Inmunología del CMN SXXI IMSS por la asesoría durante el desarrollo de este proyecto.
 - A María de Jesús Maqueda, Ninfa Arreola y Julio Ramírez por su apoyo y excelente trabajo.
 - A mis padres Gloria Martínez Gaytán y Sergio Patiño Martínez, mi motivación y mi ejemplo seguir. Gracias por el apoyo, pero sobre todo por el cariño y la entrega que nos brindan día a día para hacer mí y mis hermanos mejores personas.
 - A mis hermanos Sergio, Omar y Andrea a los cuales les brindo mi admiración y respeto.
 - A Yaremi López Hernández por su apoyo, amistad y cariño.
 - A mis compañeros de laboratorio Ana Belén, Angélica, Erika, Adrián, Pepe, Deyanira, Rubenz por su amistad y aportes al presente trabajo.
 - A mis compañeros de generación Korina, Rosalía, Luz, Sandra, Carolina, Omars, Alfredo, Marcus y Samuel por su amistad y apoyo durante los cursos de maestría.
 - A los Doctores y compañeros del Departamento de Biomedicina por las facilidades y disponibilidad del uso de los equipos pertenecientes a sus laboratorios.
-

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN EN ESPAÑOL	3
RESUMEN EN INGLÉS	4
I.- INTRODUCCIÓN	5
1.1. El receptor nuclear Nur77	5
1.2. Nur77 en la respuesta inflamatoria	7
1.3. oxLDL y la generación de la lesión aterosclerótica	10
1.4. Funciones ateroprotectoras de Nur77	14
II.- ANTECEDENTES DIRECTOS	20
III.- JUSTIFICACIÓN	23
IV.- HIPÓTESIS	24
V.- OBJETIVO GENERAL	25
VI.- OBJETIVOS PARTICULARES	25
VII.- MATERIALES Y MÉTODOS	26
7.1. Aislamiento de monocitos	26
7.2. Generación de macrófagos M1 y M2	26
7.3. Inmunofluorescencia	26
7.4. Fraccionamiento núcleo-citoplasma. Ensayos de localización sub-celular	27
7.5. Ensayos de Western blot	27
7.6. Determinación de citocinas en los sobrenadantes de macrófagos M1 y M2	28
7.7. Tinción con Oil Red O	28
7.8. Citometría de Flujo	29
7.9. Transfección de los MΦ con siRNAs	29
7.10. Extracción de RNA	30
7.11. Análisis de expresión de transcritos por PCR punto final y PCR cuantitativa	30
7.12. Análisis estadístico	31
VIII.- RESULTADOS	32
8.1. Nur77 se expresa preferentemente en el citoplasma de los MΦ-GM y MΦ-M	32
8.2. El LPS y el Csn-B inducen la expresión de Nur77 en los MΦ-GM y MΦ-GM	33

8.3. Nur77 modula la síntesis de TNF y la expresión de marcadores de polarización en los MΦ	37
8.4. Evaluación del perfil fenotípico y funcional de los MΦ-GM y MΦ-M tras el estímulo con LDL y oxLDL	39
8.5. Generación de MΦ deficientes en la expresión de Nur77	43
IX.- DISCUSIÓN	46
X.- CONCLUSIONES	50
XI.- PERSPECTIVAS.....	51
XII.- BIBLIOGRAFÍA	52

ABREVIATURAS

15-LO: 15-lipooxigenasa

Ab: anticuerpo

Apo: apolipoproteína

COX: ciclooxigenasa

CRP: proteína C reactiva

Csn-B: cytosporone B

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos

IFN: interferón

I κ B: inhibidor de κ B

IL: interleucina

LDL: lipoproteína de baja densidad

LPS: lipopolisacárido bacteriano

MACS: Magnetic Cell Sorting

MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos

MCP: proteína quimioattractante de monocitos

MPO: mieloperoxidasa

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos

M Φ : macrófago

M Φ -GM: macrófagos generados con GM-CSF

M Φ -M: macrófagos generados con M-CSF

NBRE: nerve-growth-factor inducible gene B -NGFI-B- responsive element

NF- κ B: factor nuclear κ B

NOS: sintasa de óxido nítrico

NurRE: elemento de respuesta a Nurr

oxLDL: lipoproteína de baja densidad oxidada

PAMP: patrón molecular asociado a patógenos

PGN: peptidoglicano

Poli (I:C): ácido poliinosínico-policitidílico

PBS: Buffer salino de fosfatos

qPCR: PCR cuantitativa

SFB: suero fetal bovino

SR-A: receptor *scavenger A*

SRC-1 y SRC-2: co-activadores del receptor de esteroides

siRNA: RNA pequeño de interferencia

TGF: factor de crecimiento transformante

TLR: receptor tipo Toll

TNF: factor de necrosis tumoral

RESUMEN EN ESPAÑOL

Nur77 pertenece a la subfamilia de receptores nucleares huérfanos NR4A. Participa en diversos procesos como la inflamación, proliferación, diferenciación y supervivencia celular. En macrófagos (MΦ) humanos y murinos estímulos como el lipopolisacárido (LPS), factor de necrosis tumoral (TNF) y lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) incrementan la expresión de Nur77, lo que sugiere un probable papel de Nur77 en la respuesta inflamatoria. Varios reportes proponen a Nur77 como un factor anti-inflamatorio y ateroprotector. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha encontrado que la expresión de Nur77 está incrementada en MΦ anti-inflamatorios humanos generados a partir de monocitos con el factor estimulante de colonias de MΦ (MΦ-M) con respecto a los MΦ pro-inflamatorios generados con el factor estimulante de colonias de granulocitos/MΦ (MΦ-GM). Por ello, el presente trabajo busca evidenciar el papel de Nur77 en la respuesta inflamatoria en ambas poblaciones celulares. Encontramos que sólo una subpoblación de MΦ-GM expresó Nur77 mientras que todos los MΦ-M lo presentaron, lo que sugiere una fuerte asociación de este factor de transcripción con el fenotipo anti-inflamatorio. De hecho, la deficiencia de Nur77 en los MΦ-M indicó su relevancia en el mantenimiento de una baja síntesis de TNF y, por lo tanto, de su función anti-inflamatoria. La localización de Nur77 en estado basal en ambas poblaciones de MΦ fue principalmente citoplasmática, contrario a lo reportado en otros sistemas donde la localización de Nur77 es principalmente nuclear. La expresión de Nur77 se indujo en los MΦ-GM y MΦ-M en respuesta a LPS. En este contexto, su función se asoció con la resolución de la inflamación en ambas poblaciones celulares, ya que la activación de Nur77 con un agonista (cytosporone B, Csn-B) abatió su producción de TNF en respuesta a distintos ligandos de receptores tipo Toll (TLR). Los lípidos LDL y oxLDL indujeron un cambio en el perfil fenotípico de los MΦ-M hacia un perfil pro-inflamatorio, un efecto similar al producido por Csn-B. Estos resultados podrían relacionar la inducción de la síntesis de Nur77 reportada para oxLDL y confirmada en este trabajo con la activación de este factor de transcripción inducida por Csn-B, de tal manera que Nur77 estaría mediando efectos pro-inflamatorios en los MΦ a nivel fenotípico. En resumen, Nur77 estaría implicado en la resolución de la inflamación mediante su acción inhibitoria de la síntesis de TNF por parte de los MΦ cuando éstos son activados con ligandos de TLRs, y es un factor importante para el mantenimiento de la función anti-inflamatoria de los MΦ-M. Sin embargo, su papel en la disminución de la expresión de marcadores fenotípicos anti-inflamatorios sugiere una función más compleja de Nur77.

RESUMEN EN INGLÉS

Nur77 belongs to the orphan nuclear receptor subfamily NR4A. It is involved in diverse processes such as inflammation, proliferation, differentiation and cellular survival. Stimuli like lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor (TNF) or oxidized low density lipoprotein (oxLDL) increase Nur77 expression in human and murine macrophages (M Φ), suggesting that Nur77 has a role in the inflammatory response. Several reports have proposed that Nur77 is an anti-inflammatory and atheroprotective factor. In that context, we had previously found that Nur77 expression was increased in anti-inflammatory M Φ derived from monocytes cultured with the M Φ colony-stimulating factor (M Φ -M) compared with pro-inflammatory M Φ generated with granulocyte/M Φ colony-stimulating factor (M Φ -GM). In the present work we evaluated the role of Nur77 in both M Φ populations. We found that only a subpopulation of M Φ -GM expressed Nur77 whereas it was present in all M Φ -M, suggesting a strong association of this transcription factor with the anti-inflammatory profile. In fact, the Nur77 deficiency indicated its relevance in the maintenance of low TNF secretion by M Φ -M and, therefore, in their anti-inflammatory function. The Nur77 intracellular localization in M Φ -GM and M Φ -M was predominantly cytoplasmic in the steady-state, which was opposed to that reported in other cellular systems where its subcellular distribution was mostly nuclear. LPS induced Nur77 expression in both M Φ -GM and M Φ -M. In that context, its function was associated with resolution of inflammation, since Nur77 activation with an agonist (cytosporone B, Csn-B) abrogated TNF production by M Φ stimulated with various Toll-like receptor (TLR) ligands. The lipids LDL and oxLDL provoked a phenotypic shift in M Φ -M towards a pro-inflammatory profile, an effect analogous to that induced by Csn-B. These results could associate the induction of Nur77 expression by oxLDL already reported and confirmed in the present work with the activation of this transcription factor by Csn-B, thus Nur77 would be mediating pro-inflammatory effects in the M Φ at the phenotypic level. In conclusion, Nur77 could be involved in the resolution of inflammation by virtue of its inhibitory effect on TNF synthesis by M Φ activated with TLR ligands, and is also a relevant factor in the maintenance of the anti-inflammatory profile of M Φ -M. However, its contribution to the decrement of anti-inflammatory phenotypic markers suggests a more complex function of Nur77.

I.- INTRODUCCIÓN

1.1. El receptor nuclear Nur77

Nur77 pertenece a la subfamilia de receptores nucleares NR4A conformada por tres diferentes receptores Nur77 (*NR4A1*), Nurr1 (*NR4A2*), y NOR1 (*NR4A3*). Estos receptores también reciben el nombre de receptores nucleares huérfanos, llamados así porque se cree que funcionan de una manera independiente de ligando, pero éste no ha sido descrito (1-4). Su estructura contiene dominios ampliamente conservados entre las diferentes familias de receptores nucleares, y consiste en un dominio de transactivación independiente de ligando (AF-1) en la región N-terminal, un dominio de unión a DNA (DBD) altamente conservado compuesto por dos dedos de zinc, y un dominio de unión a ligando (LBD) que contiene un dominio de transactivación dependiente de ligando (AF-2) en su extremo C-terminal (Fig. 1) (5).

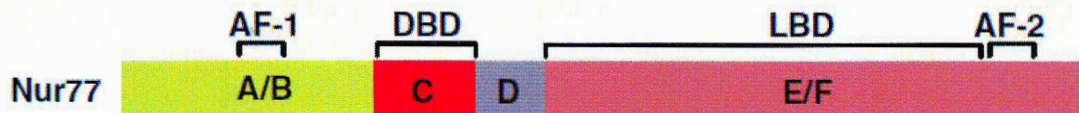


Figura 1. Representación esquemática de los dominios estructurales de Nur77 (6).

Sin embargo, a pesar del parecido estructural con otros receptores nucleares, los receptores NR4A no funcionan de una manera clásica, ya que se ha observado que su LBD contiene una superficie hidrofílica, contrario al clásico orificio hidrófobo que media el reclutamiento de moléculas co-activadoras en otros receptores nucleares (7), por lo que se cree que su actividad transcripcional es independiente de la unión de un ligando al dominio LBD y en su lugar parece ser dependiente de la actividad co-activadora y transcripcional del dominio AF-1 (8, 9). Entre algunos de los procesos en los que se cree participa Nur77 se encuentran la inflamación, proliferación, diferenciación y supervivencia celular (10).

Los receptores NR4A activan la transcripción uniéndose como monómeros u homodímeros sobre secuencias consenso en el DNA de sus genes blanco (Fig. 2); una de

ellas es la secuencia canónica NBRE (*nerve-growth-factor inducible gene B* -NGFI-B-*responsive element*) A/TAAAGGTCA (11,12), mientras que los homodímeros y heterodímeros entre los miembros de la subfamilia NR4A se unen preferencialmente al elemento de respuesta a Nurr (NurRE), constituido de una secuencia relacionada a NBRE (AAATG/AC/TCA) de repetidos invertidos encontrada en el promotor del gen de proopiomelancortina (13). Además Nur77 y Nurr1 pueden heterodimerizar con el receptor Retinoide X (RXR) y activar la transcripción a través de un elemento DR-5 de una manera dependiente del ácido 9-cis-retinoico (14, 15). Inicialmente se pensaba que los receptores NR4A solamente activaban genes, pero estudios recientes probaron la primera evidencia de que Nurr1 puede también reprimir la transcripción de genes inflamatorios reclutando complejos co-represores (16).

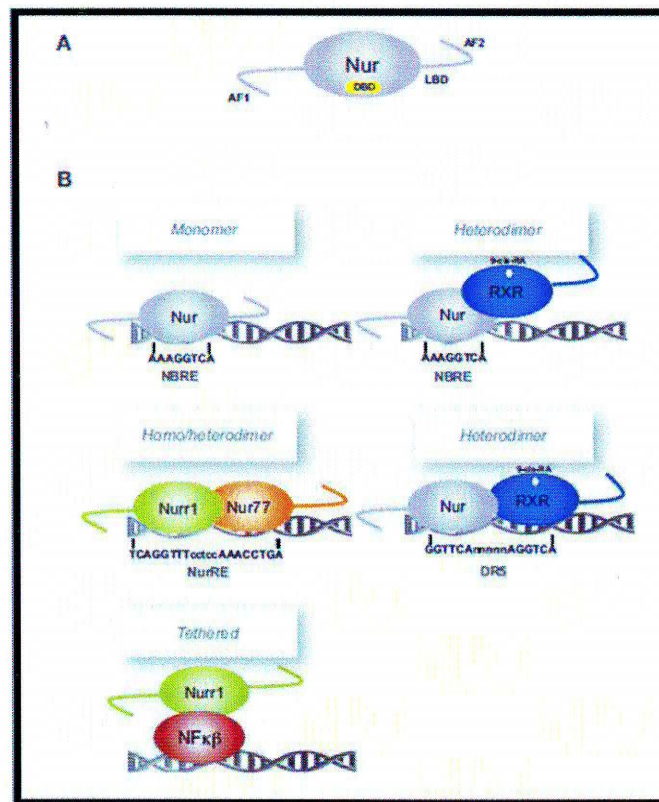


Figura 2. Reconocimiento de los elementos de respuesta a NBRE y NuRE por factores de transcripción de la familia NR4A y por otros factores adicionales (17).

El hecho de que el LBD de Nur77 se encuentre inaccesible ha sugerido que las funciones de Nur77 son reguladas principalmente a nivel de modificaciones postraduccionales. Actualmente se conoce que los tres NR4A son fosforilados en residuos de serina en respuesta a varias cinasas que se activan por factores de crecimiento, incluyendo las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3K), la proteína cinasa B (PKB/Akt), la cinasa Jun-N-terminal (JNK) y la cinasa ribosomal S6 (RSK) (18 - 21). Ejemplo de ello, es la fosforilación de las serinas 350 y 354 dentro del dominio de unión a DNA, la cual inhibe la actividad transactivadora de Nur77 (22, 23). Las modificaciones postraduccionales de Nur77 pueden por un lado modular la activación de las funciones transactivacionales de Nur77 y por otro lado modificar su localización subcelular, llevándolo desde el citoplasma al núcleo (importación) o viceversa desde el núcleo hacia el citoplasma (exportación), donde también se ha reportado que Nur77 se encuentra regulando la activación de la apoptosis en linfocitos T y células cancerígenas (24, 25). Además, Nur77 se ha propuesto como un factor de regulación metabólica debido a que su activación induce un incremento en la expresión de genes involucrados en la gluconeogénesis como glucosa-6-fosfatasa (*G6pc*), fructosa bisfosfatasa 1 (*Fbp1*), *Fbp2*, y enolasa 3 (*Eno3*), los cuales contienen secuencias NBRE en sus promotores (26). También existen reportes donde la sobre-expresión adenoviral de Nur77 incrementa los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) mientras que disminuye los de lipoproteínas de alta densidad (HDL), además de reducir los niveles hepáticos de triglicéridos. Se cree que el efecto es resultado de la represión del factor lipogénico SREBP1c (27).

1.2. Nur77 en la respuesta inflamatoria

Actualmente se ha propuesto que Nur77 podría estar regulando de alguna manera la respuesta inflamatoria, esto debido a los reportes que existen donde se ha demostrado que la expresión de todos los receptores NR4A se ve incrementada en respuesta al estímulo con lipopolisacárido (LPS) bacteriano o factor de necrosis tumoral (TNF) sobre macrófagos (MΦ) derivados de monocitos humanos (Fig. 3a), células mielomonocíticas humanas THP-1, MΦ murinos derivados de médula ósea, MΦ peritoneales murinos y células macrofágicas murinas RAW264.7. Esta expresión inducible en MΦ se cree que depende de la activación de la señalización a través del factor nuclear (NF)-κB, ejemplificada por el reclutamiento de NF-κB a los elementos de respuesta en el promotor

de Nur77 (Fig. 3b) (25, 28), y que se comprueba por los resultados de ensayos con genes reporteros llevados a cabo con las transfecciones de diferentes construcciones del promotor de Nur77 (Fig. 3c). Actualmente se han identificado en los promotores de ratón y de humano de Nur77 secuencias de unión a NF- κ B y AP-1 altamente conservadas, y se ha confirmado la importancia de los elementos NF- κ B ya que su depleción resulta en una reducción del 50–60 % de la actividad de luciferasa (25).

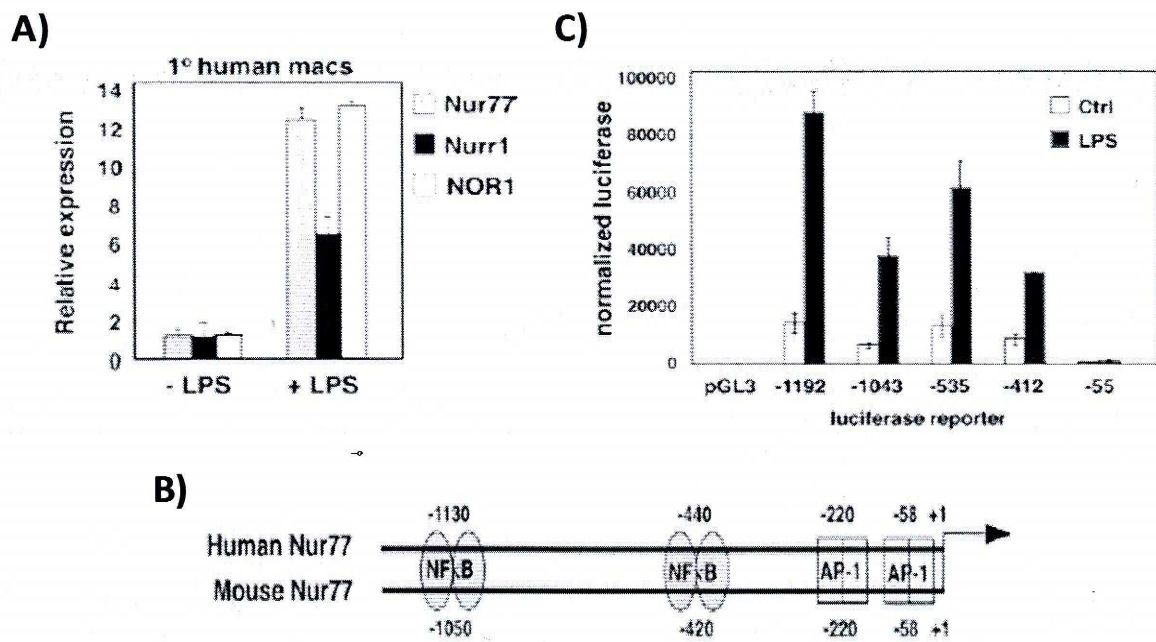


Figura 3. Análisis de la expresión de Nur77, Nurr1 y NOR1 en respuesta a LPS en M Φ humanos. A) Expresión relativa de los receptores NR4A en M Φ humanos derivados de monocitos tras 5 h de estimulación con LPS (500 ng/mL). B) Representación esquemática de los promotores de ratón y humano de Nur77 y sus posibles sitios de unión a NF- κ B y AP-1. C) Actividad de luciferasa en células RAW 264.7 transfectadas con las construcciones indicadas del promotor de Nur77 y tratadas con PBS o LPS (500 ng/mL) tras 18 h de estimulación (25).

Además de los estímulos como el LPS y TNF, también se ha reportado que Nur77 es inducido en células THP-1 y RAW 246.7 en respuesta a la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL), una variante de la LDL generada de manera natural por el organismo a partir de un desequilibrio en los sistemas oxidantes y antioxidantes) (Fig. 4), la cual se ha

identificado como la responsable del inicio del proceso inflamatorio en la aterosclerosis y que además será objeto de estudio en el presente trabajo (25, 29). Sin embargo el mecanismo de inducción de Nur77 tras el estímulo con oxLDL no está completamente descrito. Se ha propuesto que esta inducción es mediada a través de la vía de señalización de las MAPK, específicamente p38, ya que el pretratamiento de células RAW 246.7 con un inhibidor de p38 y el posterior estímulo con oxLDL genera que la expresión de Nur77 se abata dramáticamente (29).

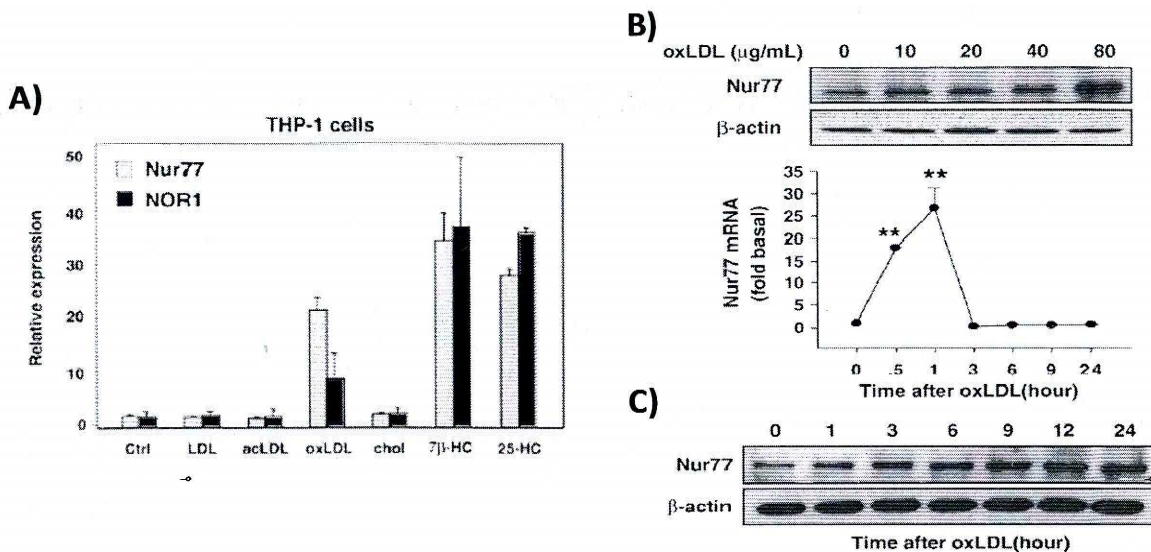


Figura 4. Nur77 es inducido en células THP-1 y M Φ humanos en respuesta a oxLDL y otros lípidos modificados asociados a aterosclerosis. A) Expresión del mRNA de Nur77 en células THP-1 diferenciadas con el éster de forbol TPA por 24 h, tratadas durante 48 h etanol (Ctrl), LDL, LDL acetiladas (acLDL), oxLDL (100 μ g/mL) o con colesterol (chol), y algunos de sus productos de oxidación [7 β -hidroxicolesterol (HC) (4 μ g/mL), 25-HC (4 μ g/mL)] (25) B) Immunoblot de la expresión de Nur77 en células RAW 264.7 tratadas con diferentes concentraciones de oxLDL por 24h. C) Expresión del mRNA de Nur77 tras la estimulación con 40 μ g/mL de oxLDL (29).

Sin embargo, aún no es del todo claro cuál es la función de Nur77 durante la respuesta inflamatoria. Algunos reportes sugieren que Nur77 estaría involucrado en una regulación negativa de la misma, esto debido a que se ha reportado que la sobre-expresión de Nur77 en células HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) incrementa la expresión del inhibidor de NF- κ B, I κ B, a través de los elementos de respuesta a Nur77 presentes en el promotor de I κ B. Como consecuencia, la translocación de NF- κ B hacia el núcleo se ve

disminuida y con ello la respuesta inflamatoria (30). En este contexto se ha reportado que la expresión de las citocinas interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-8 se vio disminuida en células THP-1 que sobre-expresaban Nur77 estimuladas con LPS o TNF (Fig. 5). Tanto los niveles de mRNA como de proteína se vieron disminuidos en comparación con las células THP-1 control tranfectadas con los vectores vacíos (mock) y posteriormente estimuladas con LPS o TNF. Este efecto se revirtió cuando se utilizaron RNA pequeños de interferencia (siRNA) dirigidos contra Nur77 o NOR-1, incrementándose la expresión de IL-1 β e IL-8, además de incrementarse la proteína quimioattractante de monocitos (MCP)-1 (31).

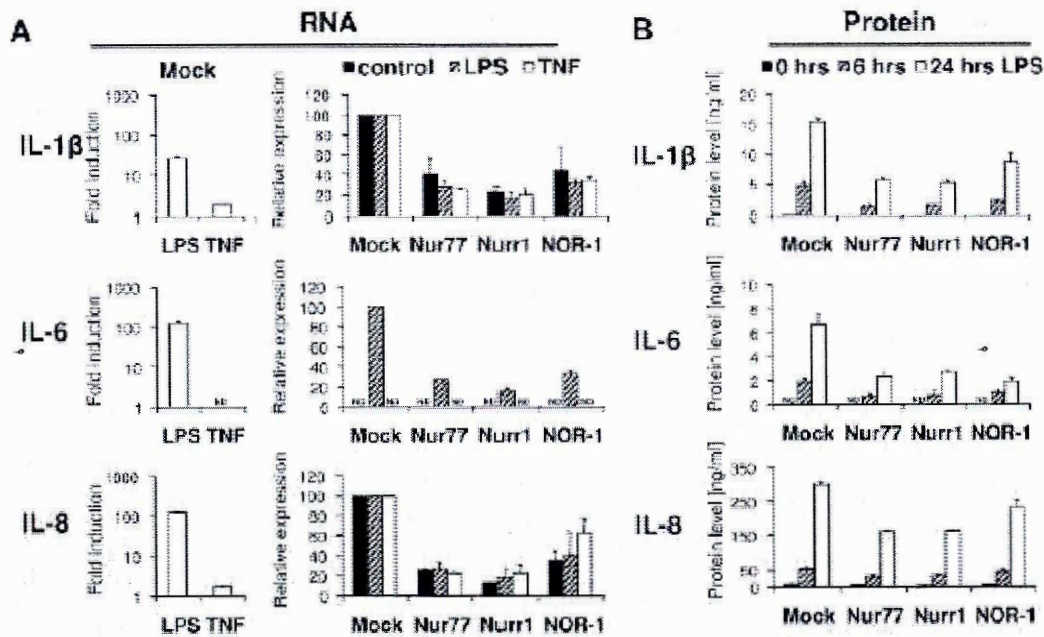


Figura 5. Disminución de la respuesta inflamatoria asociada a los factores NR4A. La respuesta inflamatoria disminuye en células THP-1 estimuladas durante 3 h con LPS (100 ng/mL) o TNF (20 ng/mL) que sobreexpresaban Nur77, NOR-1 y Nurr1, disminuyendo la expresión del mRNA (A) y de la proteína (B) de IL-1 β , IL-6 e IL-8, analizados a la 0, 6 y 24 h (31).

1.3. oxLDL y la generación de la lesión aterosclerótica

La aterosclerosis es la principal causa de desarrollo de enfermedades cardiovasculares (CVD) como la enfermedad cardíaca coronaria y el accidente cerebrovascular. La

Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta en el 2011 que 17.11 millones de muertes a nivel mundial fueron a causa de un padecimiento cardiovascular; es por ello que los padecimientos cardiovasculares han sido catalogados como la principal causa de muerte a nivel mundial. En México, las enfermedades isquémicas del corazón y cerebrovasculares ocuparon el segundo y quinto lugar dentro de las principales causas de muerte con 74,057 y 31,905 muertes, respectivamente, durante el 2012 (32). Actualmente la aterosclerosis es catalogada como una enfermedad inflamatoria crónica que surge por el desbalance metabólico de lípidos y su posterior acumulación en la capa más interna de la arteria, la íntima, originando una respuesta inflamatoria exacerbada y permanente que se observa como engrosamientos focales asimétricos de la íntima denominados "placas ateroscleróticas" (33, 34). Las placas ateroscleróticas no se distribuyen al azar; existen lugares en el endotelio vascular que predisponen al desarrollo de este tipo de lesiones y se tienden a formar en las curvaturas interiores y puntos de ramificación de las arterias, donde el flujo laminar puede ser perturbado o insuficiente para mantener el estado normal del endotelio (35). Las lesiones ateroscleróticas comienzan como estrías grasas subyacentes al endotelio de las arterias. Las estrías en un inicio están formadas por depósitos de lípidos que posteriormente pasan a ser oxidados por sistemas oxidantes como la mieloperoxidasa (MPO), sintasa de óxido nítrico (NOS) y 15-lipoxigenasa (15-LO) (36). La oxidación de los lípidos por estos sistemas da origen a la oxLDL. La oxLDL acumulada en la pared arterial puede encontrarse en dos formas: 1) parcialmente oxidada, forma denominada mmLDL (*minimal modification*), la cual aún puede ser reconocida por los receptores para LDL (37), y 2) una forma altamente oxidada que ya no es reconocida por los receptores para LDL y que tiene modificaciones en su componente proteico apolipoproteína (Apo)-B, con residuos de lisina modificados covalentemente a partir de productos de degradación reactivos de lípidos oxidados. Inicialmente los MΦ son reclutados a las zonas de depósito con el objetivo de eliminar las partículas citotóxicas y pro-inflamatorias de oxLDL (37). Sin embargo la progresiva acumulación de MΦ en la zona afectada y su continua captación de oxLDL conllevan al desarrollo de lesiones ateroscleróticas y a una respuesta inflamatoria exacerbada (38).

La captación de oxLDL por los MΦ genera un tipo de células denominadas "células espumosas", con un alto contenido de ésteres de colesterol característicos de la aterosclerosis. La acumulación de colesterol en estas células se cree que está mediada por la captación de formas modificadas de LDL a través de varios receptores *scavenger* (Fig. 6) (39). Aunque varias proteínas contribuyen a este proceso, se ha demostrado que

los receptores *scavenger* SR-A (*Scavenger receptor - A*) y CD36 tienen los papeles más importantes en este proceso (40). Por ejemplo, ratones deficientes de Apo-E que carecen de SR-A o CD36 presentan un desarrollo menor de aterosclerosis comparada con los ratones control, lo que se puede comprobar por la reducción en las áreas de lesión en los ratones carentes de estos receptores (41). Una vez dentro de los MΦ el "pool" de colesterol derivado de oxLDL consiste en colesterol libre y en ésteres de colesterol que son hidrolizados en los lisosomas. El colesterol libre tiene varios destinos; uno de ellos es ser transportado hacia el retículo endoplásmico, donde es sometido a una re-esterificación por la acetil-coenzima A: colesterol acetil-transferasa 1 (ACAT1) que forma colesteril-ésteres de ácidos grasos, lo que proporcionan el aspecto de "espuma" de las células espumosas (42). La transición entre la aparición de la estría grasa hacia una lesión más compleja está caracterizada por la inmigración de células musculares lisas de la capa media de la arteria hacia la capa íntima. Las células musculares lisas de la íntima pueden proliferar y captar lipoproteínas modificadas, contribuyendo así a la formación de células espumosas y a la síntesis de proteínas de matriz extracelular, lo cual conlleva al desarrollo de una capa fibrosa característica de una inflamación crónica (43).

La fase de lesión está influenciada por las interacciones entre monocitos/MΦ, células T, citocinas, quimiocinas, mastocitos y células dendríticas, lo que resulta en un amplio rango de respuestas tanto celulares como humorales. En la zona de la lesión se han encontrado células T activas expresando tanto citocinas de tipo Th1 como Th2. Los MΦ, las células endoteliales y las células musculares lisas también se encuentran activadas, como lo demuestran su alta expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II y la liberación de citocinas y quimiocinas inflamatorias como TNF, IL-6 y CCL2 (MCP-1) (44). Las citocinas Th2 parecen tener un efecto anti-aterogénico. Por ejemplo, la IL-4 tiene efectos antagonistas sobre la actividad del interferón (IFN)- γ en MΦ e inhibe la actividad Th1. Sin embargo también la IL-4 es un potente inductor de 15-LO, la cual promueve la oxidación de LDL. La IL-10 regula la actividad Th1, tiene actividades desactivadoras sobre los MΦ e impide la acumulación de lípidos (45, 46).

Otro factor a tomar en cuenta en el desarrollo de aterosclerosis es la presencia de auto-anticuerpos dirigidos contra lípidos y proteínas modificadas por oxidación. Se ha observado que más del 10 % de las clonas de linfocitos T CD4⁺ obtenidas de lesiones carótidas humanas proliferan específicamente en respuesta a oxLDL de un manera dependiente de HLA-DR (44). Además, existen varios reportes en humanos y ratones

sobre una fuerte correlación entre la presencia de auto-anticuerpos contra epítomos de oxLDL y el grado de aterosclerosis; sin embargo, se desconoce si tales auto-anticuerpos son simples marcadores del grado de daño o si tienen una función patofisiológica en la enfermedad (47).

Como resultado final, las lesiones ateroscleróticas avanzadas pueden conducir a eventos cardiovasculares agudos generalmente como resultado de la ruptura de placas y trombosis. La ruptura de la placa expone los lípidos de la placa hacia los componentes sanguíneos, lo cual inicia la cascada de coagulación, la adherencia de plaquetas y la trombosis, resultando en las complicaciones y síntomas clínicos del infarto al miocardio y accidente cerebrovascular (47).

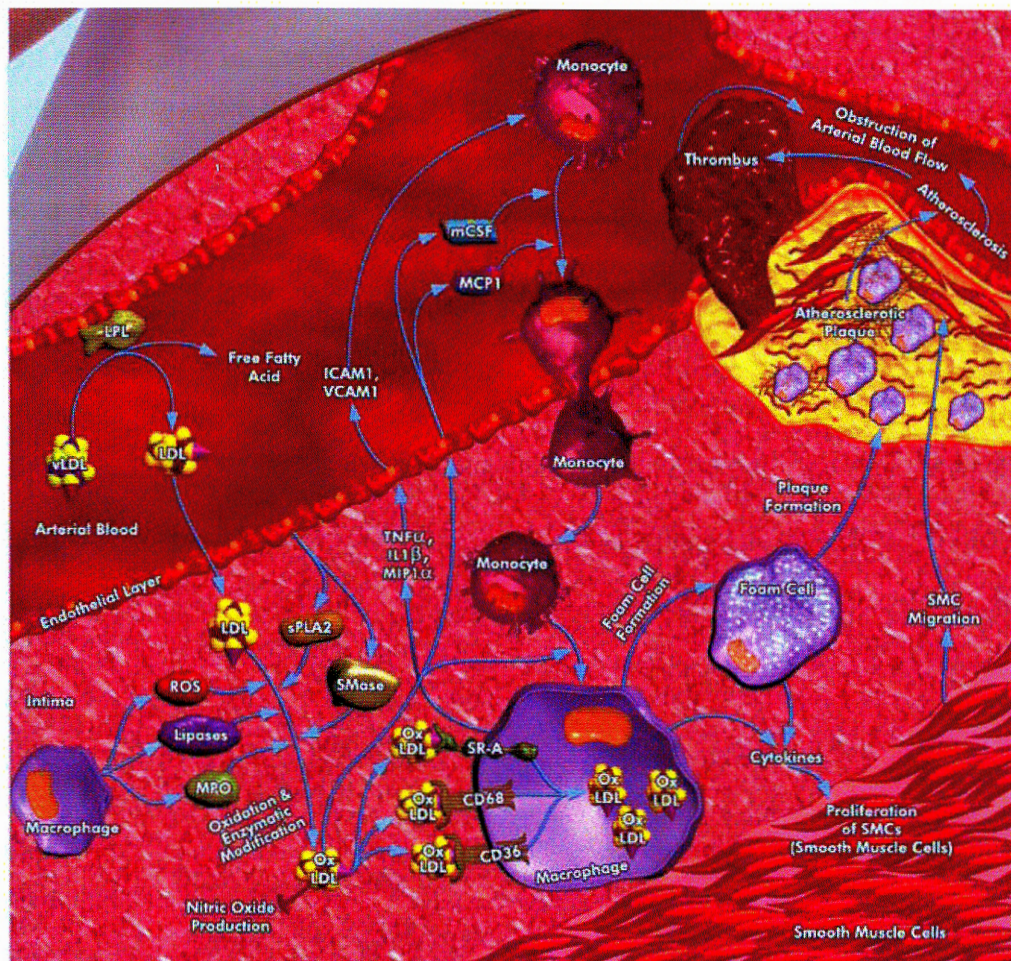


Figura 6. Evolución de la lesión aterosclerótica. La aterosclerosis es una enfermedad caracterizada por el acumulo de lipoproteínas en la capa íntima de los vasos sanguíneos grandes y medianos, principalmente la LDL. La LDL se acumula en la capa íntima y es susceptible a ser oxidada por los sistemas oxidantes derivados de los M Φ presentes en la zona. Una vez que la LDL es oxidada (oxLDL), la oxLDL puede ser captada por los receptores *scavenger* presentes en los M Φ (CD36, SR-A, CD68) lo que conlleva a la activación y al desarrollo de un estado inflamatorio en el endotelio. La producción de citocinas pro-inflamatorias que conllevan a la activación del endotelio y la continua captación de oxLDL genera un estado activo permanente de los M Φ presentes en la zona de afección, generando las características células espumosas presentes en la lesión aterosclerótica madura. El continuo estado inflamatorio conlleva a la activación y migración de las células musculares lisas, lo cual está asociado con la formación de una placa aterosclerótica madura que en estados avanzados de la enfermedad es susceptible a ruptura, lo que puede conllevar a la obstrucción del flujo sanguíneo (48).

1.4. Funciones ateroprotectoras de Nur77

Debido a que Nur77 es inducido tras el estímulo con oxLDL, recientemente diversos grupos de investigación han enfocado sus estudios sobre las posibles funciones que Nur77 pudiera estar regulando durante el desarrollo de la aterosclerosis. Actualmente se propone a Nur77 como un factor ateroprotector, debido a los reportes donde se ha demostrado que la sobre-expresión de Nur77 en células THP-1 promueve una reducción en la captación de oxLDL por estas células mediado por la disminución en la expresión de los receptores *scavenger* SR-A y CD36 (Fig. 7) (31).

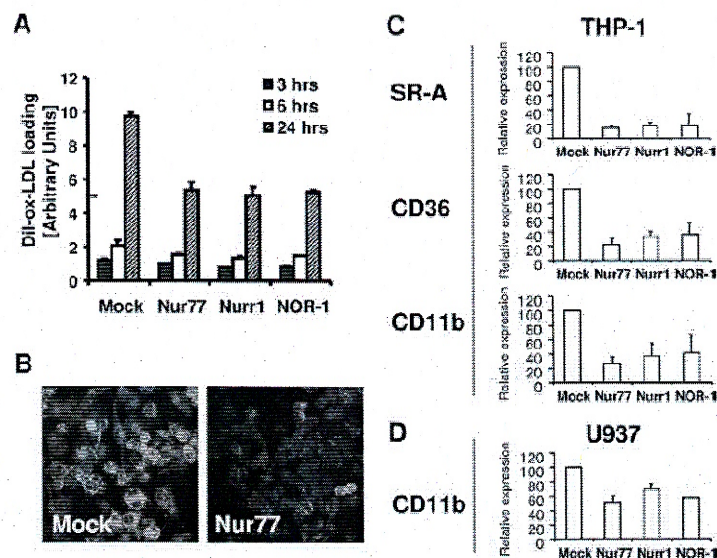


Figura 7. La sobre-expresión de los receptores NR4A reduce la captación de oxLDL en células THP-1. A) Captación de oxLDL fluorescente por células THP-1 control (mock) y por células que sobreexpresan Nur77, NOR-1 o Nurr1 por 3, 6 y 24 h. B) Análisis por microscopía confocal (24 h) de la internalización de oxLDL fluorescente en células control (mock) o transfectadas con un vector de expresión para Nur77. C) Determinación de la expresión de CD36, SR-A y CD11b en las células THP-1 tratadas como en A) (31).

Contrario a lo anterior, la generación del *knockdown* de Nur77 y NOR-1 con RNAs de interferencia (*siRNA*) resulta en un marcado incremento de la captación de oxLDL y un incremento en la expresión de SR-A y CD36 en comparación con las células transfectadas con un RNA interferente control (Fig. 8) (31).

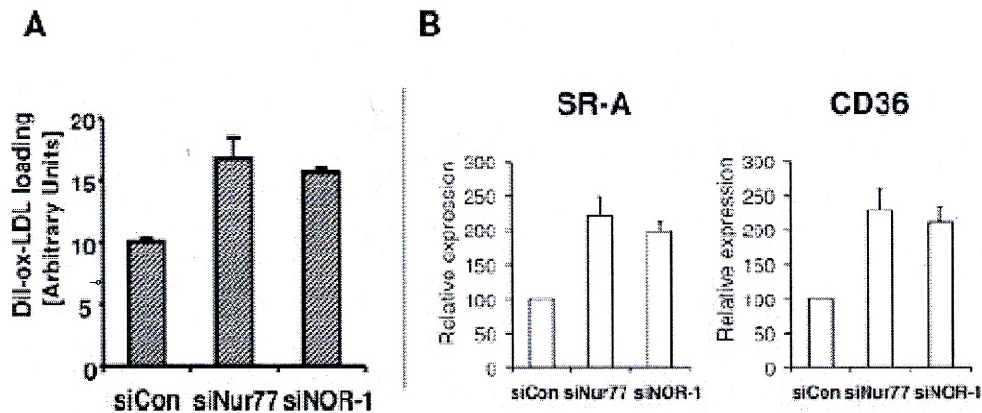


Figura 8. El silenciamiento de Nur77 incrementa la captación de oxLDL y la expresión de SR-A y CD36. La generación del *knockdown* de Nur77 y NOR-1 mediante RNA de interferencia en células THP-1 resulta en un incremento en la captación de oxLDL fluorescente y en un incremento en la expresión de SR-A, CD36 y CD11b, evaluado por RT-PCR cuantitativa (31).

Además, Nur77 ha demostrado reducir la expresión de citocinas pro-inflamatorias como MCP-1 y TNF tras el estímulo con oxLDL en células RAW246.7 que sobreexpresaban Nur77, mientras que el silenciamiento de Nur77 con un siRNA generó un efecto contrario al incrementarse los niveles de MCP-1 y TNF (Fig. 9) (29).

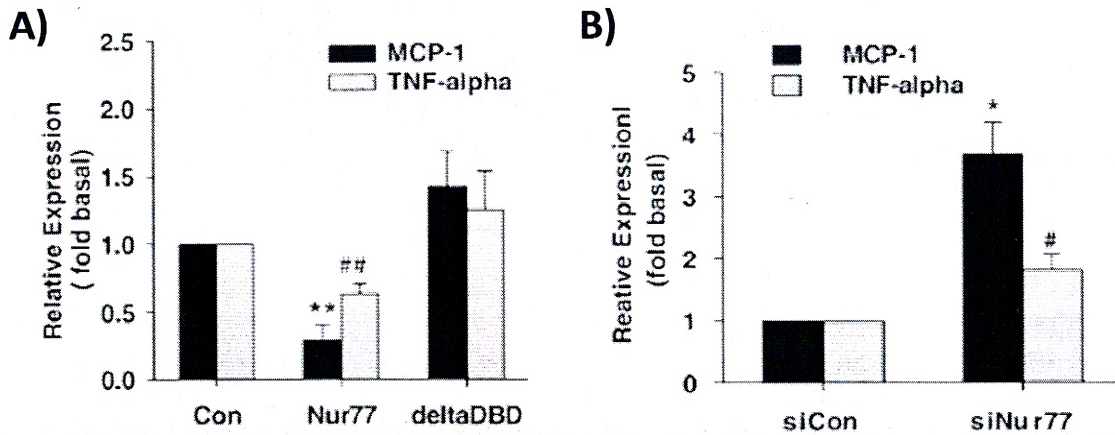


Figura 9. Disminución de TNF y MCP-1 tras la estimulación con oxLDL. La sobre expresión de Nur77 en células RAW246.7 disminuye la expresión de MCP-1 y TNF tras 24 h de estimulación con oxLDL (A), mientras que el efecto se ve revertido con la sobre-expresión de Nur77 que carece del dominio DBD (deltaDBD) (A) o con el silenciamiento de Nur77 mediante el uso de un siRNA (B) (29).

In vivo, la ausencia de Nur77 en ratones deficientes de Apo-E (Apo-E^{-/-} Nur77^{-/-}) alimentados con una dieta alta en grasas ha sido asociada con un incremento en el daño de la lesión aterosclerótica en la aorta aunado a un incremento en el reclutamiento de MΦ a la zona de lesión y un incremento en el contenido lipídico (Fig. 10) (49).

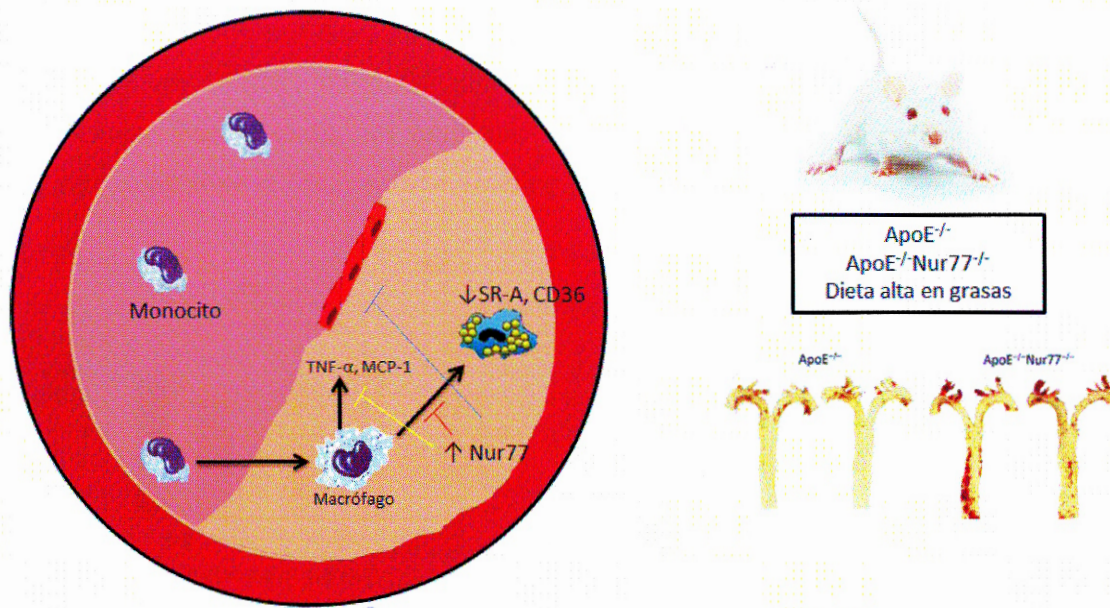


Figura 10. Nur77 como factor ateroprotector. La sobre-expresión de Nur77 se ha asociado con la disminución en la expresión de TNF y MCP-1, en la captación de oxLDL en la activación del endotelio. *In vivo*, la deficiencia de Nur77 se asocia a un aumento en la lesión aterosclerótica ligado a un incremento en el reclutamiento de MΦ y una mayor captación de lípidos en la zona de lesión (29) (30) (31) (49).

Aunado a que la inducción de Nur77 suprime la expresión de TNF y MCP-1, y que la activación de la ciclooxigenasa (COX)-2 está implicada en la expresión de estas dos moléculas (50), Shao y col. reportaron que el estímulo con oxLDL incrementa la expresión de COX-2, y que el tratamiento con el inhibidor de COX-2 NS398 reduce la expresión de citocinas TNF y MCP-1 en respuesta a oxLDL. Por lo tanto, oxLDL estaría incrementando la respuesta inflamatoria a través de COX-2. Estos resultados sugieren que la inhibición de COX-2 es necesaria para bloquear la respuesta inflamatoria a oxLDL, y por lo tanto Nur77 pudiera estar regulando la expresión de COX-2. Investigaciones posteriores indicaron que el promotor de COX-2 contiene un sitio de unión a Nur77 (NBRE, AAAGGTCA) y que la expresión de Nur77 inhibía la actividad del promotor de COX-2 (Fig. 11A), además de que la inducción de COX-2 por oxLDL también se veía disminuida en presencia de Nur77. El efecto se vio revertido cuando se utilizó un siRNA dirigido contra Nur77 (Fig. 11C). Estos hallazgos indican que Nur77 atenúa la expresión de COX-2 inducida por oxLDL en MΦ. Por lo tanto se puede proponer que la oxLDL es capaz de

activar a los MΦ a través de dos vías, una pro-inflamatoria mediada por COX-2 y una anti-inflamatoria mediada por Nur77. Nur77 ejerce propiedades anti-inflamatorias que atenúan la actividad de COX-2, mientras que COX-2 induce la producción de citocinas pro-inflamatorias. Por lo tanto, un equilibrio entre estas dos vías sería requerido para el adecuado control de la respuesta inflamatoria (29).

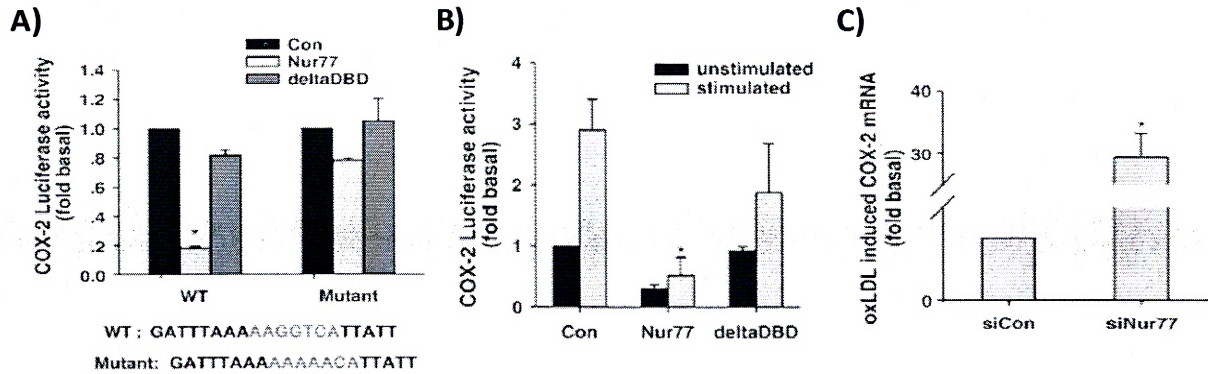


Figura 11. Nur77 inhibe la actividad de COX-2 inducida por oxLDL. A) Ensayos de luciferasa en células RAW 264.7 transfectadas con una construcción del promotor de COX-2 silvestre (WT) o con una mutación en un sitio de unión a Nur (NBRE: AAAGGTCA), y co-transfectadas con vectores que contienen el gen de Nur77, el gen de Nur77 con una delección en su dominio DBD (deltaDBD), o el vector vacío (Con). B) Estas células fueron estimuladas con oxLDL (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h y se evaluó la actividad del promotor de COX-2 mediante ensayos de luciferasa. C) Evaluación de la expresión del mRNA de COX-2 tras el silenciamiento de Nur77 mediante la transducción de un siRNA en células RAW 264.7 y la posterior estimulación con oxLDL (29).

Con base en los antecedentes aquí expuestos, podemos proponer que Nur77 es un regulador negativo de la respuesta inflamatoria, debido a que tanto el estímulo con LPS, TNF, u oxLDL inducen por un lado una respuesta pro-inflamatoria (producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias) a través de la activación de NF- κ B o de la vía de las MAPK; mientras que por otro lado el incremento en la expresión de Nur77 tras los estímulos pro-inflamatorios conlleva a una regulación negativa de la respuesta inflamatoria cuyos mediadores aún no están totalmente descritos (Fig. 12).

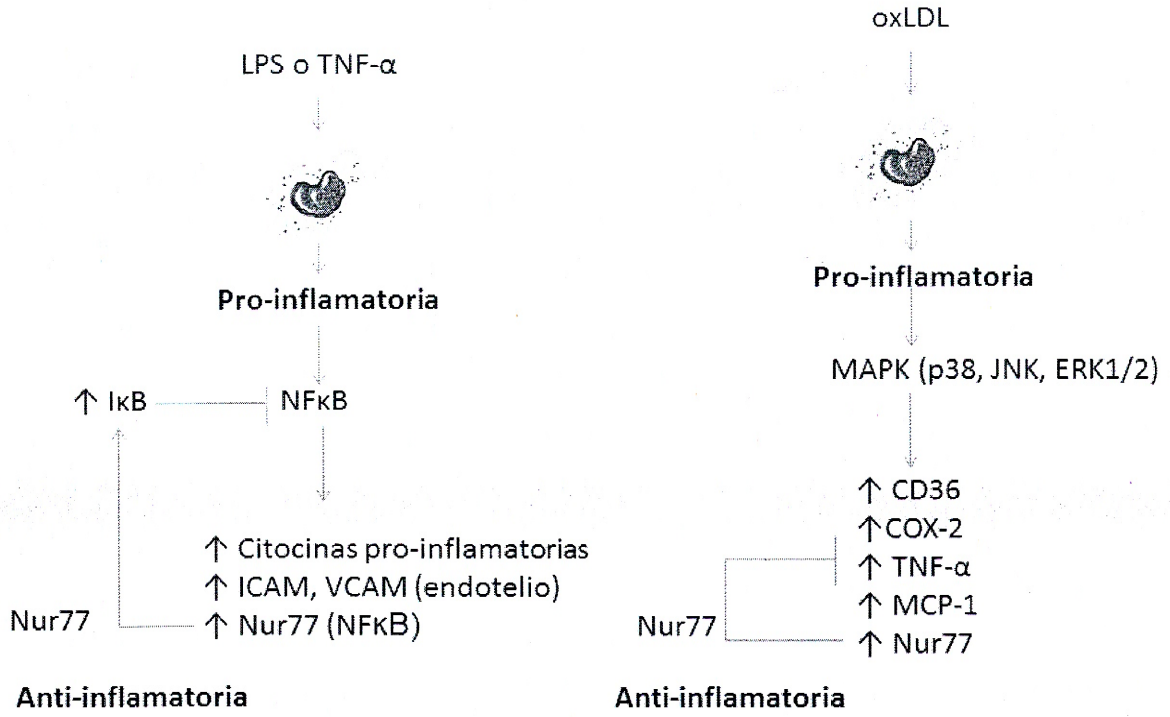


Figura 12. Nur77 como regulador negativo de la respuesta pro-inflamatoria.

II.- ANTECEDENTES DIRECTOS

Los MΦ humanos generados *in vitro* a partir de monocitos con las citocinas factor estimulante de colonias de MΦ (M-CSF, denominados en adelante MΦ M2 o MΦ-M) y factor estimulante de colonias de granulocitos/MΦ (GM-CSF, denominados en adelante MΦ M1 o MΦ-GM) tienen papeles opuestos durante las respuestas inflamatorias e inmunitarias, y estos MΦ son considerados como anti- y pro-inflamatorios, respectivamente. Los MΦ-M tienen una morfología elongada en forma de huso, mientras que los MΦ-GM son más redondeados y tienen una morfología similar a un "huevo frito". Las principales diferencias entre ambos están marcadas por las citocinas que secretan, así como por algunos marcadores específicos de cada población. Por ejemplo, los MΦ-GM producen IL-1β, IL-6, TNF, IL-12 p40, IL-18 e IL-23, e inducen respuestas de tipo Th1, mientras que los MΦ-M liberan grandes cantidades de IL-10 y tienen una muy baja capacidad de inducir la proliferación de los linfocitos T y la secreción de IFN-γ (51, 54). En cuanto a la expresión de marcadores, los MΦ M1 se caracterizan por sus altos niveles de CD1b, CD71, IL-18R, HLA-DQ y del factor de transcripción PU.1 (familia Ets), mientras que los MΦ-M presentan una alta expresión de HLA-I, CD11c, CD14, CD16, CD32, CD115, del receptor *scavenger* CD163, del receptor de folato (FR)β y de los factores de transcripción c-maf y MAFB (familia bZip) (51, 52).

El agonista de Nur77 cytosporone B (Csn-B) es un octaquétido (Fig.13) aislado del hongo endofítico *Dothorella* sp. HTF3 que se une al dominio de unión a ligando de Nur77, específicamente a la Tyr453, estimulando así sus actividades transactivadoras. Se ha reportado que otro mecanismo por el cual Csn-B incrementa la actividad de Nur77 es a través del reclutamiento de las moléculas co-activadoras acetil-transferasas de histonas SRC-1 y SRC-2 (*Steroid Receptor Coactivators*), potenciando así su asociación con ambas (10^{-6} M). Se cree que Csn-B estimula la actividad transactivadora de Nur77 sobre genes blanco incluyendo al propio Nur77, el cual contiene múltiples elementos de respuesta a Nur77. Se ha reportado que Csn-B incrementa la inducción de la apoptosis mediada por Nur77, aumenta la inhibición del crecimiento de tumores de xenoinjertos en ratones y potencia la gluconeogénesis en hígado de ratones (55).

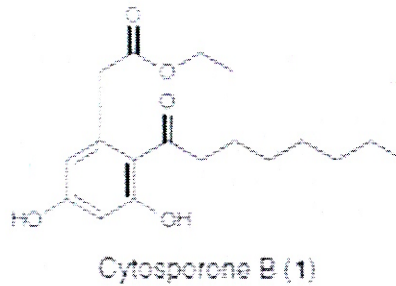


Figura 13. Estructura del agonista de Nur77 cytosporone B (55).

Recientemente, Csn-B ha sido utilizado en estudios con células espumosas derivadas de M Φ THP-1 donde al ser estimuladas con 10 $\mu\text{g/mL}$ de Csn-B durante 24 h se disminuye la captación de oxLDL (15.5 %) y el contenido lipídico, incrementándose así el flujo de salida. Además, el tratamiento con Csn-B incrementó la expresión de IL-18, factor de crecimiento transformante (*TGF*)- β y CD40, mientras que disminuyó la expresión del mRNA de *IL1B*, *IL6*, *IL12A*, *TNF*, proteína C reactiva (*CRP*) y la molécula de adhesión intercelular 1 (*ICAM1*) (Fig. 14) (56).

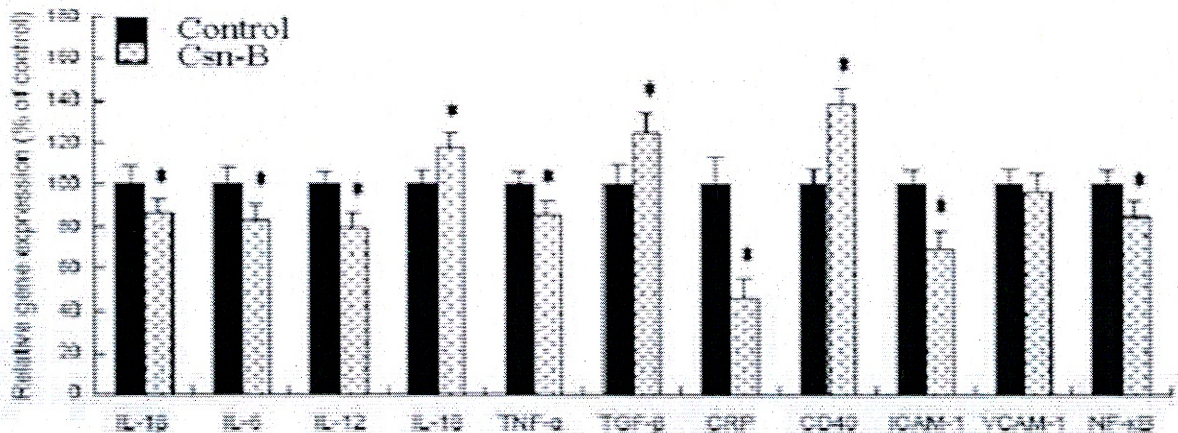


Figura 14. El tratamiento con Csn-B evidencia las funciones anti-inflamatorias de Nur77. M Φ derivados de células THP-1 fueron incubados 24 h en presencia de Csn-B (10 $\mu\text{g/mL}$) y después estimulados con 5 $\mu\text{g/mL}$ de oxLDL durante 24 h, la expresión génica fue evaluada mediante PCR cuantitativa (56).

Con base en los reportes que evidencian un papel anti-inflamatorio de Nur77, y debido a las características pro-inflamatorias de los M Φ M1 y anti-inflamatorias de los M Φ M2, en nuestro grupo de trabajo se evaluó la expresión de Nur77 en ambas poblaciones de M Φ (Fig. 15), encontrando que existe una mayor expresión de Nur77 en los M Φ M2. Este hallazgo nos llevó a preguntarnos: ¿la expresión de Nur77 podría estar influyendo en las características de inflamación de ambos tipos de M Φ ?

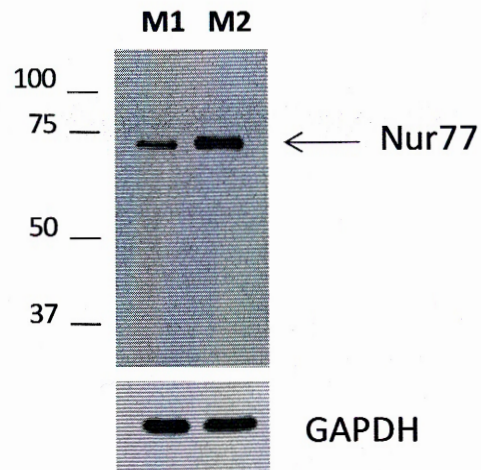


Figura 15. Los M Φ humanos diferenciados con M-CSF expresan una mayor cantidad de Nur77 que los diferenciados con GM-CSF. Expresión de Nur77 en M Φ -GM (M1) y M Φ -M (M2) diferenciados durante 6 días con GM-CSF y M-CSF respectivamente. El Western blot se realizó a partir de lisados totales de ambos tipos de M Φ . GAPDH se empleó como control de carga del experimento. Los números indican los pesos moleculares de los marcadores.

III.- JUSTIFICACIÓN

Existen reportes que asocian la expresión de Nur77 en macrófagos con funciones anti-inflamatorias y ateroprotectoras. Además, se desconocen o se encuentran sólo parcialmente descritas las moléculas involucradas en la polarización del fenotipo de los macrófagos. Se propone evaluar la función del receptor nuclear Nur77 en la modulación de la respuesta inflamatoria de los macrófagos humanos polarizados.

IV.- HIPÓTESIS

La expresión del factor de transcripción Nur77 modula el perfil inflamatorio de los macrófagos polarizados M1 y M2.

V.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la función de Nur77 en la modulación de la respuesta inflamatoria de los macrófagos humanos polarizados.

VI.- OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la expresión y localización subcelular de Nur77 en los macrófagos M1 y M2 en condiciones basales y tras el estímulo con oxLDL, LPS o un agonista de Nur77.
 2. Evaluar el perfil de citocinas y la expresión de moléculas características del fenotipo M1 y M2 en estos macrófagos en respuesta a los estímulos anteriores.
 3. Determinar el efecto de LPS en los macrófagos tras la eliminación transitoria de la expresión de Nur77.
-

VII.- MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Aislamiento de monocitos

Los concentrados leucocitarios fueron obtenidos a partir de donantes sanos del Banco de Sangre del CMN "La Raza" del IMSS. Las células fueron sometidas a un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (densidad 1.077 g/mL). Las células fueron centrifugadas a 800 xg durante 30 min a temperatura ambiente y se aislaron las células mononucleares (PBMC) de la interfase entre el Ficoll y el plasma. La población de monocitos CD14+ fue purificada a partir de 400×10^6 de PBMC por selección positiva mediante MACS (*Magnetic Cell Sorting*) utilizando un anticuerpo (Ab) anti-CD14 conjugado con microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec).

7.2. Generación de macrófagos M1 y M2

Los monocitos CD14+ se cultivaron a una densidad de 0.7×10^6 células/ml en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM y antibióticos 1%. El medio fue suplementado con GM-CSF (1000 U/ml, ProBiomed) o con M-CSF (10 ng/ml, Calbiochem) para inducir la diferenciación de los monocitos hacia M Φ de tipo M1 y M2 respectivamente. Las citocinas se adicionaron al tiempo 0, día 2 y día 4. Una vez alcanzado el sexto día los M Φ maduros fueron sometidos a diversos estímulos a diversos tiempos según lo requerido. Las condiciones de estimulación se indicarán más adelante.

7.3. Inmunofluorescencia

Los M Φ fueron cultivados en placas de 24 pozos colocando previamente en el fondo de cada pozo un cubreobjetos estéril de 13 mm. Una vez alcanzado el sexto día de diferenciación, los M Φ fueron sometidos a los siguientes estímulos: lipopolisacárido de *Escherichia coli* 0111:B4 (LPS, Sigma-Aldrich, 100 ng/ml), Cytosporone B (Csn-B, Sigma-Aldrich, 1 μ g/mL), ambos durante 18 h, oxLDL (Alfa Aesar, 10 μ g/mL) y LDL (US Biological, 10 μ g/mL), ambos durante 24 h. Los M Φ control se cultivaron durante esos mismos tiempos en ausencia de los estímulos. Una vez concluidos los tiempos de estimulación, el medio fue retirado y las células fueron lavadas con PBS. A continuación

las células fueron fijadas con formaldehído al 3.7 % (Sigma-Aldrich) durante 10 min y lavadas con PBS. A continuación se adicionó un buffer de bloqueo (Tritón X-100 0.5 %, PBS 1X, suero pre-inmune de cabra 10 µg/mL) durante 1 h. Pasado este tiempo las células fueron lavadas nuevamente con PBS y a continuación se incubó el Ab primario de conejo anti-Nur77 (Cell Signaling) o el correspondiente Ab irrelevante de conejo como control diluidos 1:100 en buffer de dilución (Tritón X-100 0.5 %, PBS, BSA 1%) durante 8 h a 4°C. Pasado este tiempo las células fueron lavadas con PBS y a continuación incubadas con el correspondiente Ab secundario acoplado a Alexa Fluor® 488 diluido 1:100 en buffer de dilución durante 1 h. En los últimos 10 minutos de incubación se adicionó DAPI para la tinción de los núcleos. Por último las células fueron lavadas con PBS y colocadas sobre un portaobjetos para su posterior análisis en un microscopio confocal Leika SP8.

7.4. Fraccionamiento núcleo-citoplasma. Ensayos de localización sub-celular

Los MΦ fueron cultivados en placas de 12 pozos. Una vez alcanzado el sexto día de diferenciación, los MΦ fueron estimulados durante 1 o 4 h con LPS o Csn-B. Los MΦ control se cultivaron durante esos mismos tiempos en ausencia de los estímulos. Posteriormente los MΦ fueron recolectados y lavados con Dulbecco's Fosfato Buffer Salino (DPBS). El aislamiento de las fracciones nucleares y citoplásmicas se llevó a cabo mediante la adición de 25 µL de buffer EB (buffer Hepes 10 mM, KCl 40 mM, MgCl₂ 3mM, NP40 0.5 %, glicerol 5%,) + 2 µL de un *cocktail* de inhibidores de proteasas. La muestra se agitó con vórtex durante 20 seg y fue incubada a 4°C durante 10 min, repitiendo estos dos últimos pasos durante 3 ciclos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante (fracción citoplásmica) fue recolectado y el pellet obtenido (fracción nuclear) se secó a temperatura ambiente. Los núcleos fueron lisados con 30 µL de SDS 5% y almacenados hasta su análisis mediante Western blot.

7.5. Ensayos de Western blot

Los lisados totales, las fracciones citoplásmicas y nucleares fueron resuspendidas en buffer de carga y resueltos en geles de SDS-PAGE al 10% bajo condiciones reductoras. A continuación las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con TBS-T (Tris 0.2 M, NaCl 1.37 M, 0.1% Tween 20) y leche en polvo

al 5%, lavadas con TBS-T, e incubadas con los Ab primarios anti-Nur77 (Cell Signaling), - Lamin B (Santa Cruz Biotech.) o -gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, Santa Cruz Biotech.) diluidos en TBS-T con BSA 0.1% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-T e incubadas con los correspondientes Ab secundarios conjugados a peroxidasa (Dako). La reacción se reveló mediante el sistema de quimioluminiscencia Immun-Star™ (BioRad Laboratories).

7.6. Determinación de citocinas en los sobrenadantes de macrófagos M1 y M2

Los MΦ fueron cultivados en placas de 48 pozos. Una vez alcanzado el sexto día de diferenciación, los MΦ fueron sometidos a los siguientes estímulos: LPS, peptidoglicano (PGN, 10 µg/mL), ácido poliinosínico-policitídílico [Poli (I:C), Invivogen, 50 µg/mL], en presencia o ausencia de distintas concentraciones de Csn-B (1-10 µg/mL) durante 18 h. Una vez terminado los tiempos de estimulación el sobrenadante fue recolectado y guardado a -80°C hasta su análisis mediante kit de ELISA comerciales (BD Biosciences) para TNF e IL-10.

7.7. Tinción con Oil Red O

Se preparó una solución stock al 0.4% (peso/volumen) de Oil Red O (Sigma Aldrich) en isopropanol. Esta solución fue diluida al 60 % con agua destilada y posteriormente filtrada. Los MΦ fueron cultivados en placas de 24 pozos colocando previamente en el fondo de cada pozo un cubreobjetos estéril de 13 mm. Una vez alcanzado el sexto día de diferenciación, los MΦ fueron sometidos al estímulo con oxLDL o LDL durante 24 h. una vez terminado el tiempo de estimulación, se retiró el medio y las células fueron lavadas con DPBS. A continuación las células fueron fijadas con formaldehído al 3.7 % durante 10 min, posteriormente lavadas con DPBS y teñidas con la solución de Oil Red O por 10 min. A continuación nuevamente se lavaron las células con DPBS y se tiñeron con hematoxilina por 10 min. Por último, las células fueron lavadas con DPBS y colocadas sobre un portaobjetos para su posterior observación mediante microscopía óptica.

7.8. Citometría de Flujo

Las células se recolectaron en un tubo estéril y se lavaron con PBS. Posteriormente se realizó el bloqueo de receptores Fc mediante la adición de inmunoglobulinas humanas a una concentración de 10 µg/mL durante 30 min. Las muestras se centrifugaron y se desechó el sobrenadante para posteriormente incubar los siguientes Ab primarios: anti-CD36, -CD163, -FRβ y sus correspondientes Ab controles de isotipo (BD Biosciences) diluidos en buffer FACS (PBS, BSA 0.1%, azida sódica 0.01%) por 30 min. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces con buffer FACS para posteriormente adicionar un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón [fracción F(ab')₂, Dako] conjugado con FITC diluido en buffer FACS durante 30 min a 4°C. Transcurrido este tiempo se procedió nuevamente a lavar las células con buffer FACS. Las células se fijaron con PBS-paraformaldehído 1% y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson).

7.9. Transfección de los MΦ con siRNAs

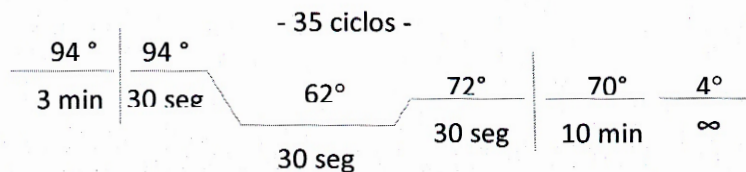
La transfección de los MΦ M1 y M2 con una mezcla de siRNA dirigidos contra el mRNA de Nur77 se realizó al cuarto día de diferenciación utilizando la tecnología de *HiPerFect Transfection Reagent* (Qiagen), la cual se basa en la formación de complejos entre los siRNA y lípidos catiónicos. El medio de cultivo fue reemplazado por 300 µL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB. En un tubo de poliestireno de fondo redondo estéril se preparó la mezcla de siRNA (específico de Nur77 o un control negativo) que consistió en 100 µL de RPMI 1640 (sin SFB), 6 µL de siRNA (concentración final 50 nM, Santa Cruz Biotech.), y 12 µL de *HiPerFect Transfection Reagent*. La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de transfección. Pasado los 10 min la mezcla fue adicionada gota a gota de manera uniforme por todo el pozo de cultivo y las células se incubaron durante 6 h en condiciones normales de 37°C y atmósfera de 5% CO₂. Pasadas las 6 h se adicionaron 800 µL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB y se adicionaron las citocinas polarizantes GM-CSF y M-CSF. El análisis de silenciamiento fue evaluado por PCR cuantitativa 48 h después de la transfección.

7.10. Extracción de RNA

Una vez recolectadas las células, la extracción de RNA se realizó con el reactivo Trizol® (Ambion). Se añadieron 250 µL de trizol a $5-7 \times 10^6$ células. Posteriormente, la mezcla se agitó en vórtex y se conservó 5 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C y se obtuvo la fase acuosa, a la cual se le añadieron 125 µL de isopropanol, se mezcló por inmersión y se incubó 10 min a 4 °C. Posteriormente se centrifugo a 10,000 rpm por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. A continuación se adicionaron 250 µL de etanol 75 % diluido en agua con dietilpirocarbonato (DEPC), se mezcló y se centrifugó nuevamente a 8,000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el RNA se resuspendió en 15 µL de agua-DEPC. El RNA se incubó a 60°C por 10 min y finalmente se cuantificó y evaluó su integridad en un gel de agarosa al 1 %.

7.11. Análisis de expresión de transcritos por PCR punto final y PCR cuantitativa

Una vez obtenido el RNA, el cDNA se obtuvo mediante el Kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific). A continuación se procedió a evaluar la expresión de *NR4A1* (Nur77) y *GAPDH* como control mediante PCR de punto final con los oligonucleótidos sense 5' TCCAGCTTGAGGTAGAAGATGC 3' y antisense 5' CTCTCTGCCCTTGTCCTCATC 3' (Nur77) y sense 5' GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3' y antisense 5' GGTGCTAAGCAGTTGGTGGT 3' (GAPDH), bajo las siguientes condiciones:



Se realizó también el análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando las sondas y oligonucleótidos prediseñados de Applied Biosystems (*TaqMan® Gene Expression Assays*) para *NR4A1* (Hs00374226_m1), *TNF* (Hs01113624_g1), y *TBP* (Tata Binding Protein, Hs00427620_m1) como control, en el sistema 7500 de Applied Biosystems, bajo las siguientes condiciones:

Componentes de reacción	µL para Rx. Vol total de 20 µL
20X TaqMan® Gene Expression Assay	0.5
2X TaqMan® Gene Expression Master Mix	10
cDNA template (1 to 100 ng)	9.5 µL (25 ng)

	Incubación UNG	Activación AmpliTaq Gold	PCR	
			40 ciclos	
			Desnaturalización	Alineamiento/Extensión
Temperatura	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Tiempo	2 min	10 min	15 seg	1 min
Volumen	20 µL			

Los valores de ΔCt (*cycle threshold*) se obtuvieron relativizando cada valor de Ct del gen problema al valor de Ct de *TBP*. Para comparar los niveles de transcritos entre dos condiciones problema se empleó la fórmula $Qr = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, donde la $\Delta\Delta Ct$ entre dos condiciones se calculó con la siguiente fórmula: $\Delta\Delta Ct_{(condición\ 1 - condición\ 2)} = (\Delta Ct_{gen-TBP})_{condición\ 1} - (\Delta Ct_{gen-TBP})_{condición\ 2}$.

7.12. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando los paquetes Excel y GraphPad Prism versión 5. Se utilizó el test paramétrico *t* de Student y los grupos de valores se expresaron como la media \pm SD. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

VIII.- RESULTADOS

8.1. Nur77 se expresa preferentemente en el citoplasma de los MΦ-GM y MΦ-M

Una vez que nuestro grupo de trabajo identificó que existía una mayor expresión proteica de Nur77 en los MΦ-M, el siguiente objetivo fue evaluar la expresión del mRNA de Nur77 en ambas poblaciones. Para ello obtuvimos el RNA de los MΦ-GM y MΦ-M diferenciados durante seis días y evaluamos el mRNA de Nur77 en ambas poblaciones mediante PCR de punto final y RT-qPCR (Fig. 16). Los resultados indican que, coincidiendo con los datos de la proteína, los MΦ-M expresaron una mayor cantidad del mRNA de Nur77 que los MΦ-GM.

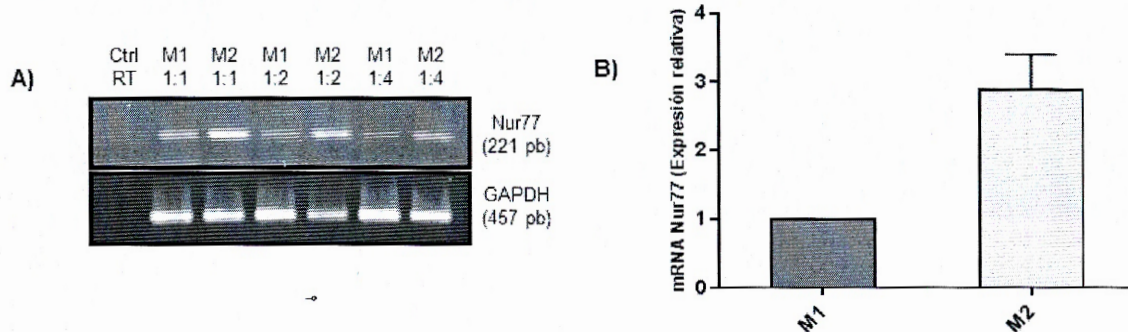


Figura 16. Expresión del mRNA de Nur77 en los MΦ-GM y MΦ-M. Evaluación de la expresión del mRNA de Nur77 mediante PCR de punto final (A) y RT-qPCR (B) en poblaciones de MΦ-GM (M1) y MΦ-M (M2), tras seis días de diferenciación. En la PCR de punto final se muestran los resultados utilizando 25 ng (1:1), 12.5 ng (1:2) y 6.25 ng (1:4) de cDNA. En (A) se empleó el gen *GAPDH* como control de la integridad del RNA. En (B) se muestran los valores de Q_r en los MΦ M2 con respecto a los MΦ M1. Los resultados son representativos de 2-3 donantes.

En cuanto a la localización sub-celular de Nur77, la evaluación por Western blot de las fracciones citoplasmática y nuclear de los MΦ M1 y M2 en estado basal (Fig. 17A) sugiere que Nur77 se expresa de manera preferencial en el citoplasma de ambas poblaciones celulares. En la fracción nuclear de los MΦ-GM no se observó expresión de Nur77, mientras que en los MΦ-M se detectó una leve expresión de Nur77 en el núcleo. Estas observaciones fueron corroboradas mediante ensayos de inmunofluorescencia (Fig. 17B), encontrando que la localización de Nur77 en el núcleo fue escasa en ambas poblaciones celulares. Además, pudimos observar que sólo una población de MΦ-GM expresa Nur77.

En los MΦ-M Nur77 se detectó en todas las células, lo que correlaciona con la mayor expresión de Nur77 en estos MΦ, si bien su expresión tampoco fue homogénea y se observaron algunas células donde Nur77 se encontró expresado con mayor intensidad.

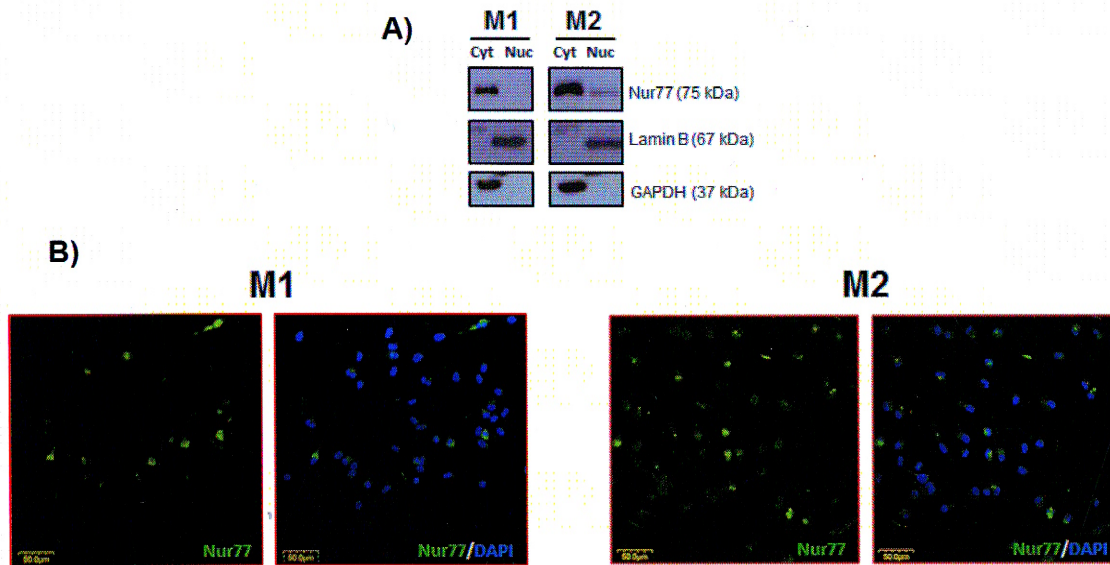


Figura 17. Evaluación de la localización subcelular de Nur77 en los MΦ-GM y MΦ-M. A) Fraccionamiento núcleo citoplasma en los MΦ-GM (M1) y MΦ-M (M2) sin estimular analizados mediante de Western blot. Lamin B y GAPDH se emplearon como controles de carga de la fracción nuclear y citoplásmica, respectivamente. B) Inmunofluorescencias de MΦ-GM (M1) y MΦ-M (M2) sin estimular y analizados mediante microscopía confocal. En los paneles izquierdos se muestra la expresión de Nur77 y en los paneles derechos su co-localización con DAPI. La escala de las barras es de 50 μm . Los resultados mostrados son representativos de un donante de cuatro evaluados.

8.2. El LPS y el Csn-B inducen la expresión de Nur77 en los MΦ-GM y MΦ-GM

Con base en los reportes que existen acerca de que LPS induce la expresión de Nur77 en otros sistemas como RAW 246.7 y THP-1, decidimos evaluar si el estímulo con LPS (100 ng/mL) y/o el agonista de Nur77 Csn-B (1 $\mu\text{g/mL}$) inducían la expresión de este factor de transcripción en nuestro sistema. Los resultados que se observan en las Fig. 18A-B indican que tanto el estímulo de LPS como de Csn-B indujeron un incremento en la expresión de Nur77 en ambas poblaciones de MΦ al tiempo evaluado de 18 h. En el caso de los MΦ-M este incremento se sustentó esencialmente en un aumento de la expresión de Nur77 en las células, ya que en estado basal prácticamente el 100% de los MΦ-M son

Nur77+. Con estos resultados corroboramos que, al igual que en otros sistemas, el LPS induce la expresión de Nur77. Además, comprobamos que el incremento de la actividad transcripcional de Nur77 inducido por su agonista Csn-B conduce al incremento de su propia expresión, probablemente a través de los elementos de respuesta a Nur presentes en el promotor de Nur77.

Con estos experimentos se procedió a investigar el porcentaje de células Nur77+ en las que este factor se encontraba en el núcleo. Hay que señalar que Nur77 se encontró siempre en el citoplasma de las células. En condiciones basales aproximadamente un 30% de los MΦ M1 y M2 Nu77+ contenían Nur77 en el núcleo. En ambos casos el número de células Nur77+ en el núcleo se incrementó con los estímulos de LPS y Csn-B, si bien este incremento fue superior en los MΦ M2 (Fig. 18B).

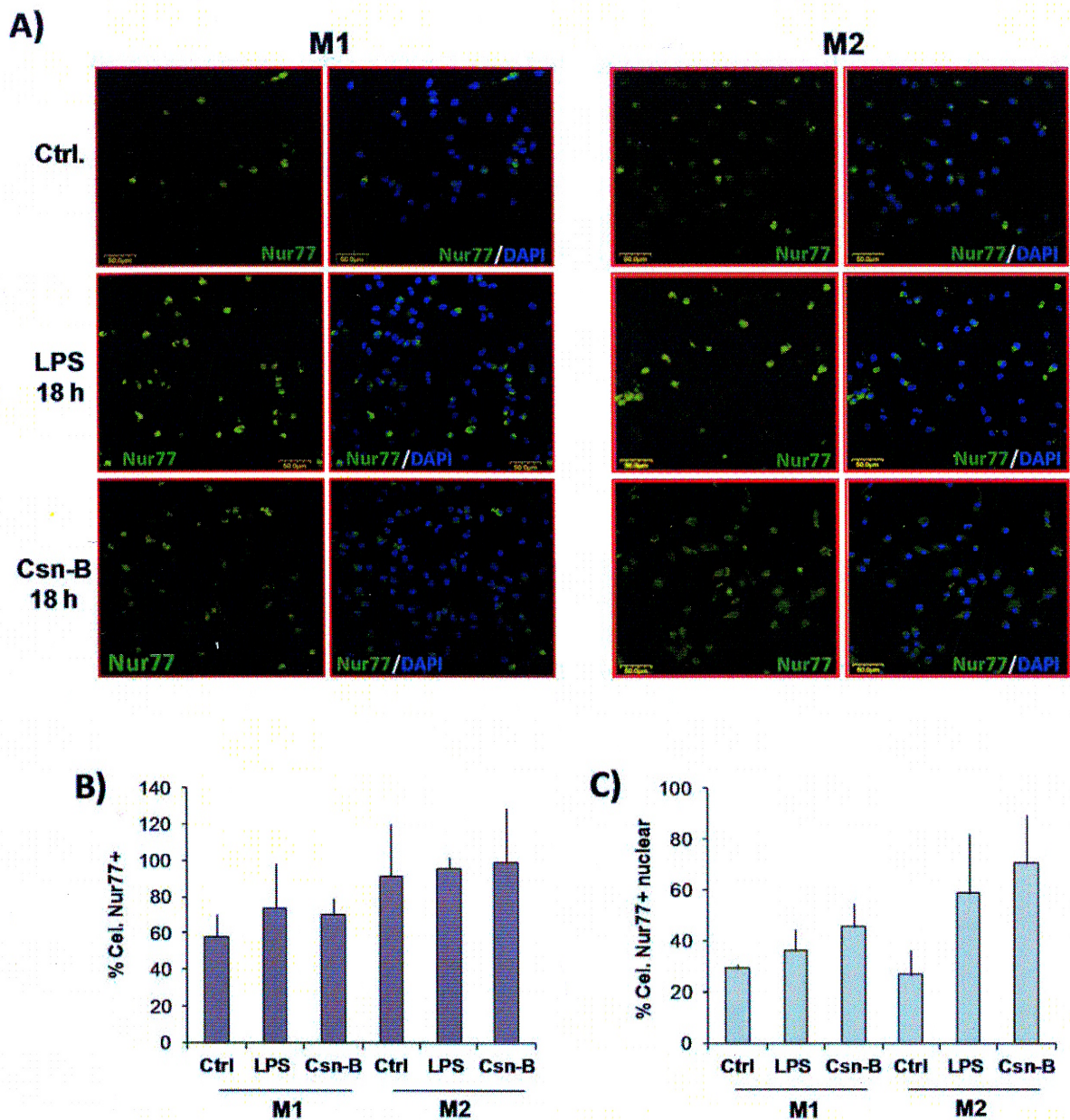


Figura 18. Evaluación del efecto de LPS y Csn-B sobre la expresión de Nur77 en los MΦ-GM y MΦ-M. A) Expresión de Nur77 en MΦ sin estimular (Ctrl.) y en los MΦ-GM (M1) y MΦ-M (M2) estimulados con LPS (100 ng/mL) o con Csn-B (1 μg/mL) durante 18 h. La evaluación se realizó mediante microscopía confocal. En los paneles izquierdos se muestra la expresión de Nur77 y en los paneles derechos su co-localización con DAPI. Los resultados mostrados son representativos de un donante de dos evaluados. La escala de las barras es de 50 μm. B) Porcentaje de MΦ-GM (M1) y MΦ-M (M2) que expresan Nur77. C) Porcentaje de células Nur77+ que presentan Nur77 en el núcleo. El total de las células Nur77+ se consideró como el 100%. Los resultados se expresan como la media ± SD de dos donantes independientes.

Con base en estos resultados, procedimos a evaluar mediante Western blot si estos estímulos que incrementan la expresión de Nur77 también inducen su translocación hacia el núcleo a tiempos más tempranos (1 y 4 h). Se observó un enriquecimiento de Nur77 en la fracción nuclear tras el estímulo con Csn-B después de 4 h, mientras que para el estímulo con LPS no se observó un enriquecimiento de Nur77 en dicha fracción a los tiempos evaluados (Fig. 19), quedando abierta la posibilidad de analizar otros tiempos. Por lo tanto, con estos datos en conjunto podemos concluir que Csn-B induce la translocación de Nur77 al núcleo en los MΦ M1 y M2 a tiempos tempranos, mientras que este efecto es menos evidente para LPS y sólo se observa a tiempos tardíos (Fig. 18C). Además, los datos indican que la translocación al núcleo de Nur77 mediada por Csn-B es más eficiente en los MΦ M2.

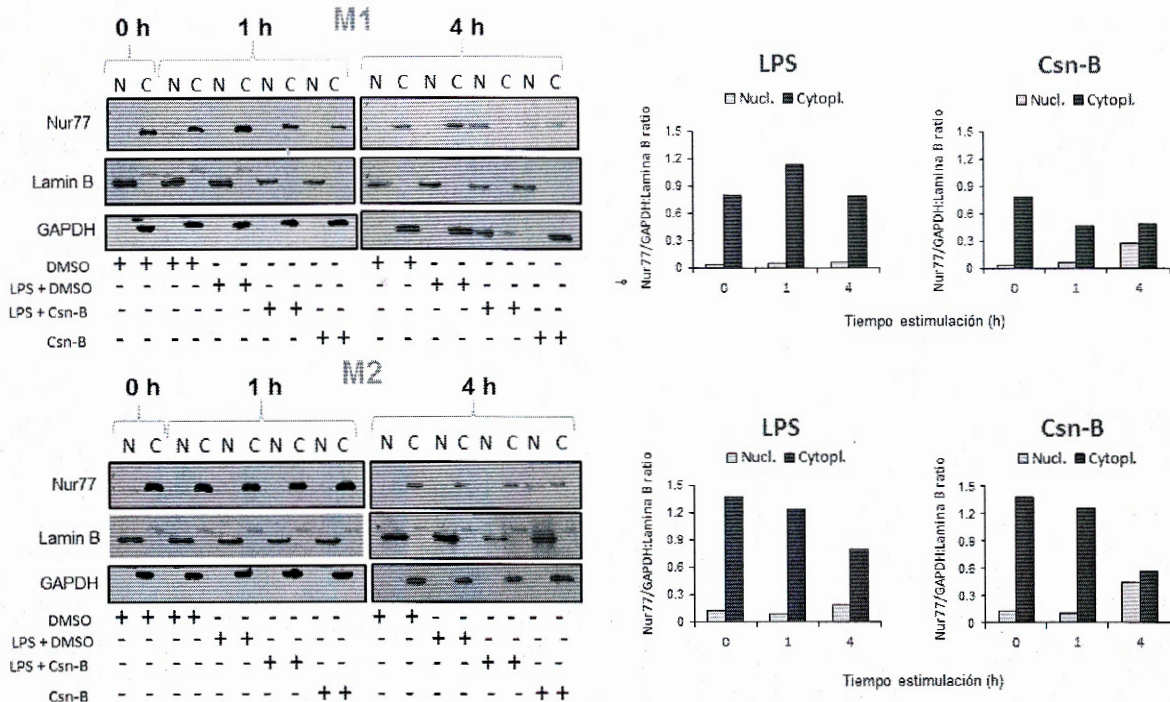


Figura 19. Evaluación de la localización subcelular de Nur77 tras los estímulos con LPS y Csn-B en los MΦ-GM y MΦ-M. Se evaluó la localización subcelular de Nur77 en MΦ sin estimular (0 h) y tras el estímulo con LPS (100 ng/mL) o Csn-B (10 µg/mL) durante 1 y 4 h. A) Imágenes representativas de la expresión de Nur77 en el núcleo (N) o el citoplasma (C) de los MΦ-GM (M1) y MΦ-M (M2), evaluadas mediante Western blot. Lamin B y GAPDH se emplearon como controles de carga de la fracción nuclear y citoplásmica, respectivamente. B) Análisis densitométrico de la expresión de Nur77 con respecto a lamin B en el núcleo (Nucl.) o con respecto a GAPDH en el citoplasma (Cytopl.), realizado mediante el software de análisis de imágenes Fiji. Se muestran los resultados representativos de un donante de 2 analizadas.

8.3. Nur77 modula la síntesis de TNF y la expresión de marcadores de polarización en los MΦ

Con base en los antecedentes que le atribuyen un papel anti-inflamatorio a Nur77, a continuación evaluamos el efecto del Csn-B sobre la producción de citocinas en respuesta a diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como el ligando del receptor tipo Toll (TLR)-4 LPS, el ligando de TLR-2 PGN y el ligando de TLR-3 Poli (I:C) (Fig. 20). El efecto fue evaluado tras 18 h de estimulación a través de la evaluación por ELISA de la citocina pro-inflamatoria TNF y de la citocina anti-inflamatoria IL-10. Los resultados aportan una evidencia más sobre el posible papel anti-inflamatorio de Nur77, ya que la producción de TNF disminuyó drásticamente tras el estímulo con LPS, PGN o Poli (I:C) en presencia de Csn-B. Además el efecto se mantuvo aún a concentraciones de 1 $\mu\text{g/mL}$ de Csn-B. Con respecto a IL-10 parece existir un efecto dependiente de dosis, donde la expresión de IL-10 se vio incrementada a concentraciones de Csn-B de 1 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para concentraciones de 10 $\mu\text{g/mL}$ la expresión de IL-10 disminuyó.

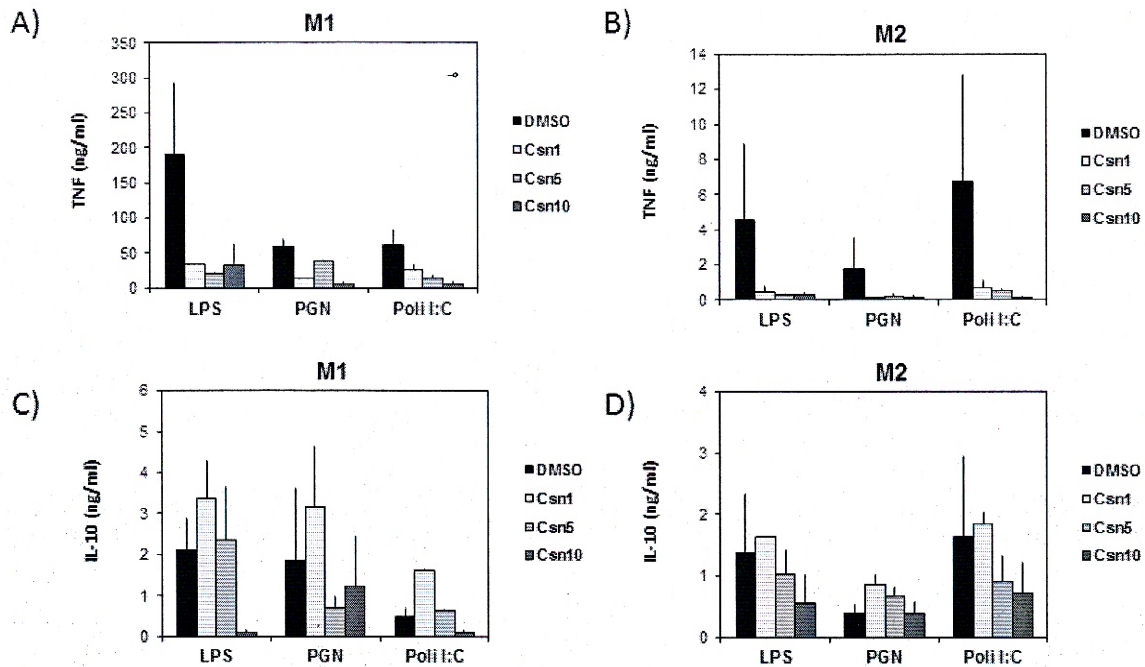
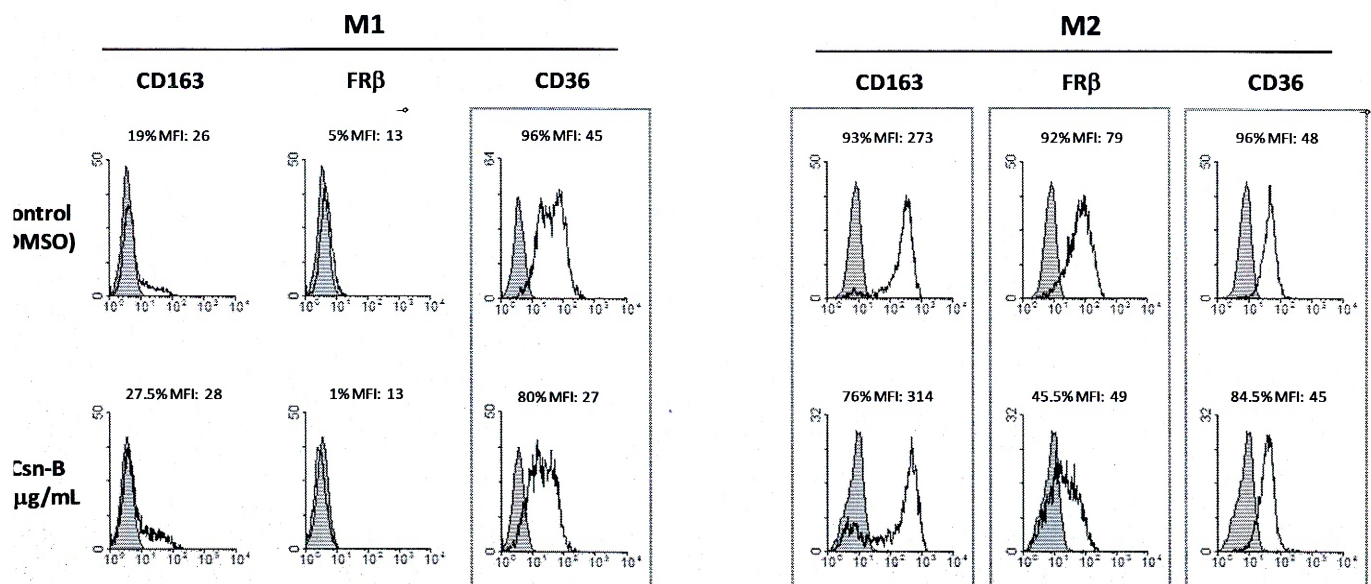


Figura 20. Nur77 disminuye la expresión de TNF en los MΦ-GM y MΦ-M. Producción de TNF (A y B) y de IL-10 (C y D) en los MΦ-GM (M1) y MΦ-M (M2) tras la estimulación con LPS (100 ng/mL), PGN (10 $\mu\text{g/mL}$) o Poli (I:C) (50 $\mu\text{g/mL}$), en presencia o ausencia (DMSO) de Csn-B a diferentes concentraciones: 10 $\mu\text{g/mL}$ (Csn10), 5 $\mu\text{g/mL}$ (Csn5) y 1 $\mu\text{g/mL}$ (Csn1). Las citocinas se evaluaron en los sobrenadantes de cultivo tras 18 h de estimulación, y los resultados mostrados representan la media \pm SD de 3 donantes independientes.

A continuación determinamos si la activación de Nur77 modificaba la expresión de marcadores de polarización en los M Φ -GM y M Φ -M. Para ello cultivamos ambos tipos celulares con Csn-B (1 μ g/mL) durante 18 h y evaluamos la expresión de los marcadores M2 CD163 y FR β . En los M Φ -GM no se detectaron cambios importantes tras la activación de Nur77 (Fig. 21). Sin embargo, los M Φ -M disminuyeron de manera importante la expresión de FR β y en menor medida de CD163 (Fig. 21), lo que sugiere una repolarización pro-inflamatoria de estas células. Como control positivo del experimento evaluamos la expresión de CD36, del cual se ha descrito que incrementa su expresión tras el *knockdown* de Nur77 (31), por lo que esperaríamos que sus niveles disminuyeran tras la activación de este factor de transcripción con Csn-B. En la Fig. 21 se muestra que la expresión de CD36 disminuye tanto en los M Φ -GM como en lo M Φ -M en presencia de Csn-B. En conjunto, estos datos nos indican que si bien Nur77 parece ejercer una función anti-inflamatoria mediada por su inhibición de la síntesis de TNF en respuesta a PAMPs, su efecto sobre el fenotipo de los M Φ en condiciones basales está orientado a la pérdida



de marcadores asociados a la resolución de la inflamación.

Figura 21. Efecto del Csn-B sobre la expresión de marcadores de polarización. Los M Φ -GM (M1) y M Φ -M (M2) fueron tratados con Csn-B (1 μ g/mL) o con vehículo (DMSO) durante 18 h y se evaluó la expresión de CD163 y de FR β mediante citometría de flujo. Se incluyen también los resultados de la expresión de CD36. Los histogramas grises corresponden a la tinción con Ab controles de isotipo, mientras que los histogramas vacíos corresponden a la expresión de CD163, FR β o CD36. En la parte superior de cada histograma se muestra el porcentaje de células positivas

y la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada marcador. En los recuadros se encuentran los marcadores que mostraron variaciones con el tratamiento

8.4. Evaluación del perfil fenotípico y funcional de los M Φ -GM y M Φ -M tras el estímulo con LDL y oxLDL

Dado que a Nur77 se le han atribuido características ateroprotectoras, parte de nuestro trabajo se centró también en evaluar la respuesta inflamatoria de los M Φ -GM y M Φ -M en respuesta a oxLDL. La parte inicial de este enfoque consistió en analizar la captación de oxLDL (10 μ g/mL) en los M Φ -GM y M Φ -M mediante la tinción con Oil Red O (Fig. 22). Para todos los ensayos utilizamos LDL (10 μ g/mL) como control. Los resultados sugieren que la población de M Φ -M presenta una mayor capacidad para internalizar lípidos tras 24 h de estimulación.

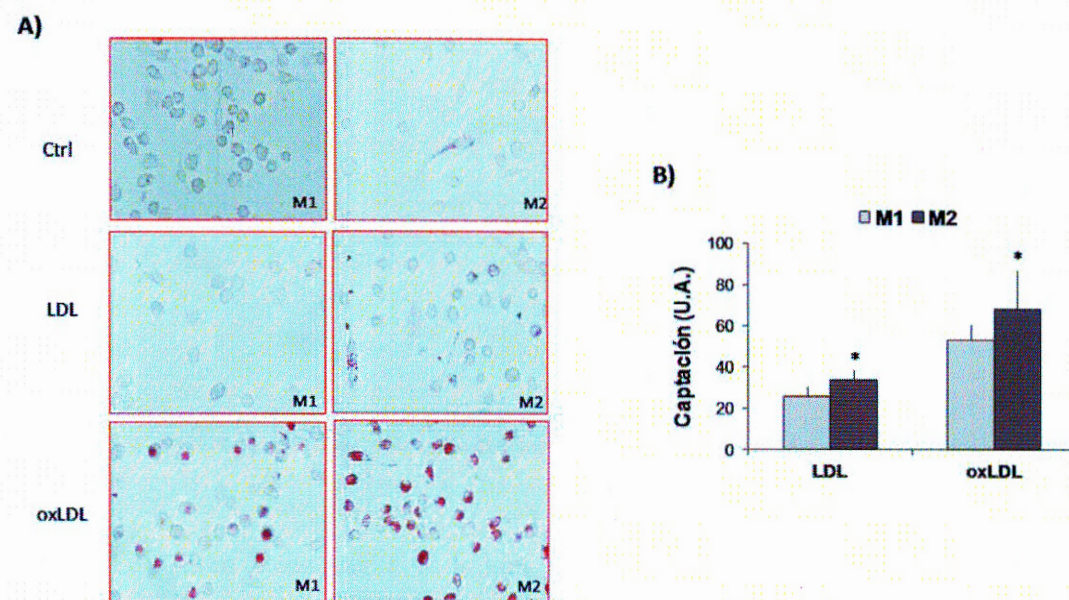


Figura 22. Los M Φ -M tienen una mayor capacidad de captación de lípidos que los M Φ -GM. Los M Φ -GM (M1) y M Φ -M (M2) fueron estimulados con LDL y oxLDL (10 μ g/mL) por 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, los M Φ fueron teñidos con Oil Red O. A) Imágenes representativas de la tinción con Oil Red O en los M Φ -GM (M1, paneles izquierdos) y en los M Φ -M (M2, paneles derechos). B) Cuantificación de la incorporación de Oil Red O en los M Φ M1 y M2, realizado mediante el software de análisis de imágenes Fiji. Magnificación 40X. * $p < 0.05$.

Adicionalmente, pudimos comprobar que la expresión de Nur77 se incrementó en los MΦ-GM tras su cultivo con oxLDL, mientras que no se apreciaron grandes variaciones en los MΦ-M (Fig. 23A). Sin embargo, el incremento en la expresión de Nur77 no condujo a una mayor acumulación de este factor en el núcleo de los MΦ-GM, y sólo se detectó un ligero incremento de Nur77 en el núcleo de los MΦ-M en presencia de LDL (Fig. 23B).

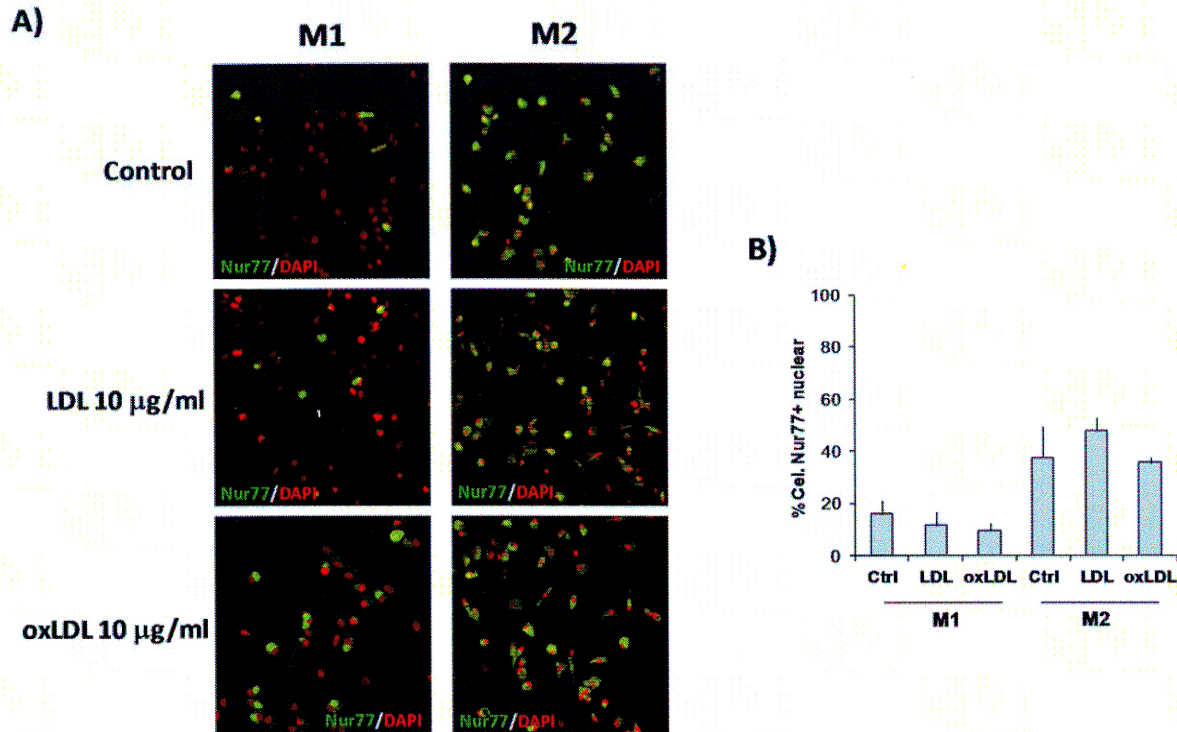


Figura 23. La expresión de Nur77 se induce en presencia de lípidos en los MΦ-GM. A) Expresión de Nur77 en MΦ sin estimular (Control) y en los MΦ-GM (M1) y MΦ-M (M2) estimulados con LDL (10 µg/mL) o con oxLDL (10 µg/mL) durante 24 h. La evaluación se realizó mediante microscopía confocal. Se muestra la expresión de Nur77 (verde) y su co-localización con DAPI (rojo). Los resultados mostrados son representativos de un donante de tres evaluados. Magnificación 40X. B) Porcentaje de células Nur77+ que presentan Nur77 en el núcleo en presencia de LDL u oxLDL. El total de las células Nur77+ se consideró como el 100%. Los resultados se expresan como la media ± SD de dos donantes independientes.

Una vez comprobado que los MΦ-GM y MΦ-M eran capaces de captar LDL y oxLDL decidimos evaluar mediante citometría de flujo si existía una modificación en los perfiles de expresión del receptor *scavenger* CD36 (principal receptor de oxLDL) y de moléculas

características del fenotipo M2 (CD163, FR- β) tras el estímulo con estos lípidos durante 24 h (Fig. 24 y 25).

La expresión de CD36 se vio disminuida en los M Φ M1 y M2 sólo en presencia de oxLDL, lo que probablemente se deba a la internalización de los receptores CD36 presentes en la membrana tras interactuar con su ligando oxLDL. Esta disminución fue ligeramente más intensa en los M Φ M2, lo cual se corresponde con la mayor captación de lípidos de esta subpoblación celular (Fig. 24).

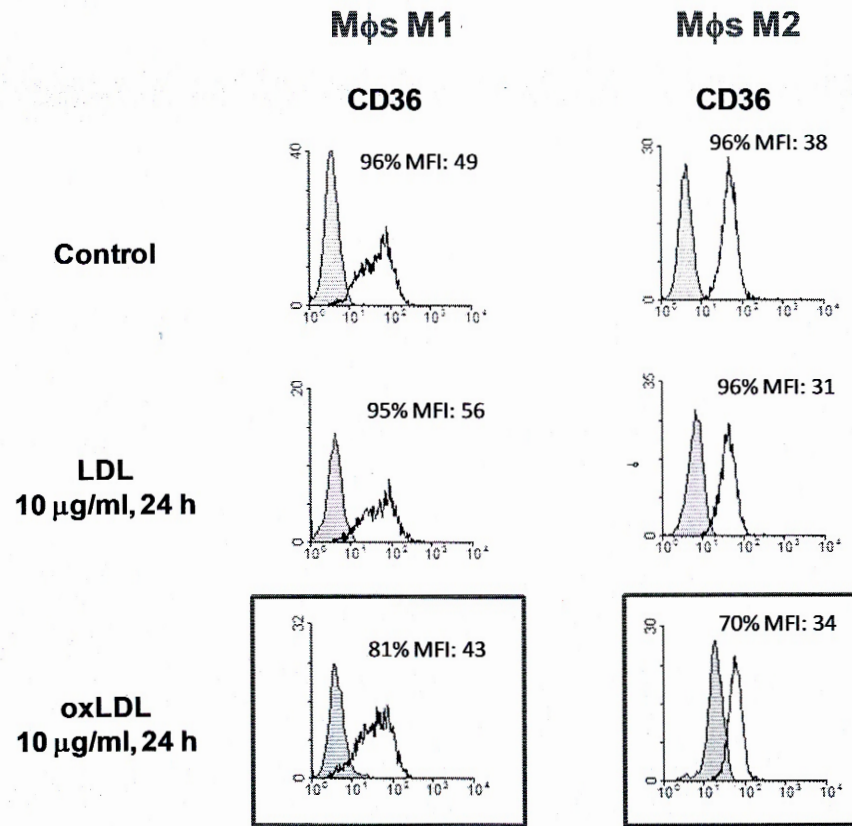


Figura 24. La expresión de CD36 disminuye tras el estímulo con oxLDL. Los M Φ -GM (M1) y M Φ -M (M2) fueron tratados con LDL u oxLDL (10 μ g/mL) por 24 h y se evaluó la expresión de CD36 mediante citometría de flujo. Los histogramas grises corresponden a la tinción con un Ab control de isotipo, mientras que los histogramas vacíos corresponden a la expresión de CD36. En la parte superior de cada histograma se muestra el porcentaje de células positivas y la MFI de CD36. En los recuadros se encuentran los marcadores que mostraron variaciones con el tratamiento.

Con respecto a la expresión de marcadores de polarización, se detectó una disminución en la expresión de CD163 y del FR β sólo en los M Φ -M en presencia tanto de oxLDL como de LDL (Fig. 25). La disminución de la expresión de CD163 fue más acentuada en presencia de oxLDL con respecto a LDL, mientras que se detectó el efecto contrario con el FR β . La expresión de estos marcadores no se modificó en presencia de lípidos en los M Φ -GM (Fig. 25). Estos resultados sugieren que LDL y su forma modificada oxLDL inducen una transición fenotípica en los M Φ -M desde un perfil anti-inflamatorio hacia un perfil pro-inflamatorio, similar a lo encontrado para el tratamiento con Csn-B.

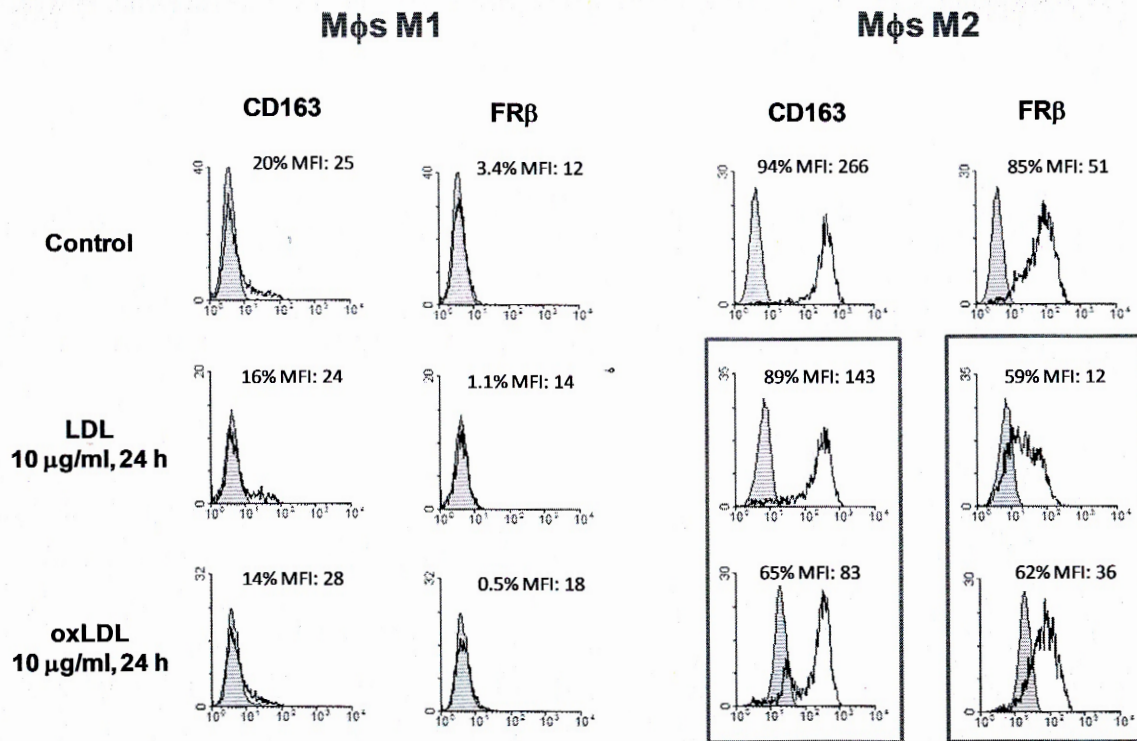


Figura 25. Los lípidos disminuyen la expresión de marcadores M2 en los M Φ -M. Los M Φ -GM (M1) y M Φ -M (M2) fueron tratados con LDL u oxLDL (10 μ g/mL) durante 24 h y se evaluó la expresión de CD163 y del FR β mediante citometría de flujo. Los histogramas grises corresponden a la tinción con Ab controles de isotipo, mientras que los histogramas vacíos corresponden a la expresión de CD163 o FR β . En la parte superior de cada histograma se muestra el porcentaje de células positivas y la MFI de cada marcador. En los recuadros se encuentran los marcadores que mostraron variaciones con el tratamiento.

Finalmente se evaluó la secreción de las citocinas TNF e IL-10 en los MΦ tras el estímulo con LDL u oxLDL (Fig. 26). Los niveles de TNF se incrementaron una media de tres veces cuando los MΦ fueron cultivados con LDL, mientras que no se modificaron en presencia de oxLDL. La producción de IL-10 no se alteró significativamente en ninguna condición.

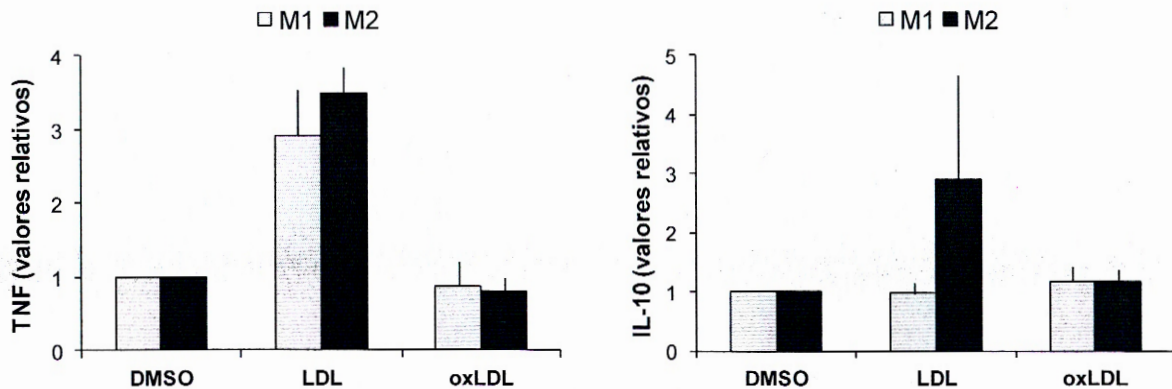


Figura 26. LDL modifica la producción de TNF en los MΦ-GM y MΦ-M. Los MΦ-GM (M1) y MΦ-M (M2) fueron cultivados durante 24 h con 10 μ g/mL de LDL u oxLDL, o dejados sin estimular (DMSO). Los sobrenadantes de cultivo fueron evaluados por ELISA para detectar la producción de TNF (panel izquierdo) e IL-10 (panel derecho). Los datos se representan relativos a la producción de las citocinas en los MΦ tratados con vehículo, y son la media \pm SD de dos experimentos independientes.

8.5. Generación de MΦ deficientes en la expresión de Nur77

Una vez que las posibles funciones de Nur77 fueron evidenciadas mediante la estimulación con el agonista de Nur77 Csn-B, nuestro siguiente objetivo fue realizar el *knockdown* de Nur77 en las poblaciones de MΦ-GM y MΦ-M a través de la transfección de una mezcla de siRNA dirigidos contra el mRNA de Nur77. Antes de realizar las transfecciones evaluamos la expresión del mensajero y proteína de Nur77 durante la diferenciación de monocitos hacia MΦ-GM y MΦ-M (Fig. 27). En ambas poblaciones celulares no se detectó expresión a nivel de proteína en el día uno de diferenciación, mientras que sí se observó la expresión del mRNA. En el tercer día de diferenciación los niveles de proteína comenzaron a elevarse en ambas poblaciones de MΦ, y en el quinto día la expresión proteica de Nur77 se elevó considerablemente, alcanzando su máxima de expresión en los dos tipos de MΦ. El mRNA de Nur77 alcanzó su pico de expresión al tercer día de diferenciación en los MΦ-GM, mientras que en los MΦ-M continuó

incrementando hasta el último día evaluado. Con base en estos resultados decidimos realizar las transfecciones del siRNA en el cuarto día de diferenciación, antes del momento en el que encontramos el mayor incremento en los niveles de expresión proteica de Nur77.

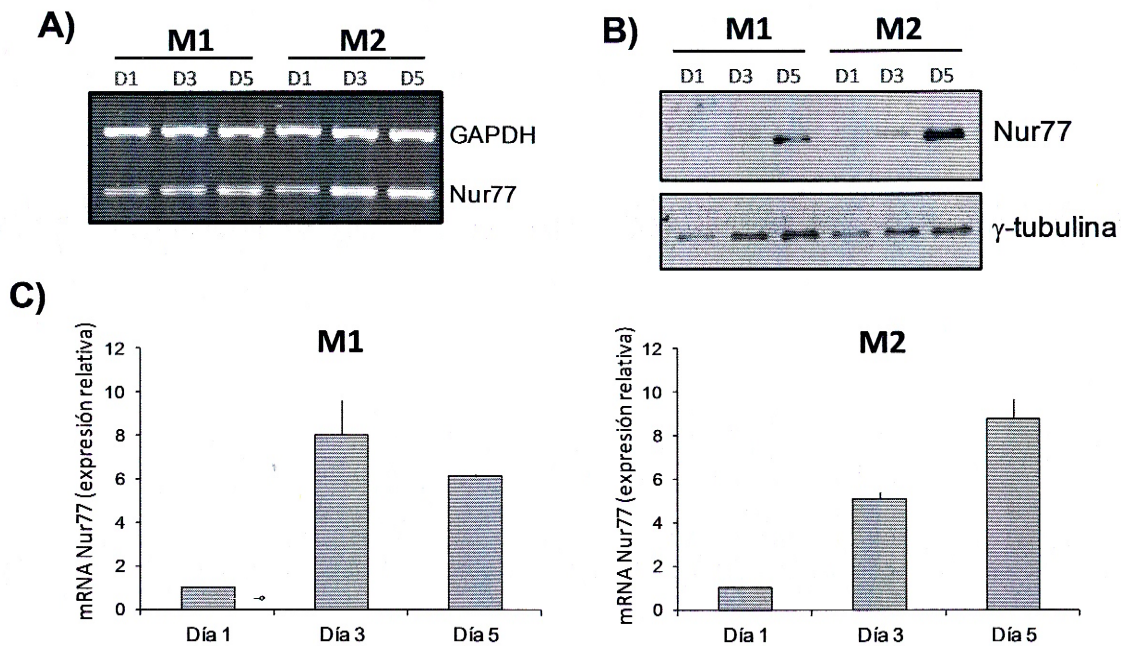


Figura 27. Expresión de Nur77 durante la diferenciación de MΦ-GM y MΦ-M. Los MΦ fueron diferenciados durante cinco días, y en los días (D) 1, 3 y 5 se extrajeron el RNA y la proteína. A) Evaluación del mRNA de Nur77 mediante PCR de punto final. GAPDH se utilizó como control de la integridad del RNA. B) Expresión proteica de Nur77 evaluada mediante Western blot. C) Evaluación del mRNA de Nur77 mediante RT-qPCR. Los datos se expresan relativos a los valores del día 1 de diferenciación en cada población celular. (A) y (B) representan los resultados de un mismo donante y (C) los resultados de un donante adicional.

Los resultados del *knockdown* de Nur77 en MΦ-GM y MΦ-M se muestran en la Fig. 28, donde podemos observar que el mRNA de Nur77 disminuyó su expresión aproximadamente en un 50 % con respecto a la condición de transfección con el siRNA control (Fig. 28A). Además, de manera interesante, ambas poblaciones de MΦ transfectadas con el siRNA específico de Nur77 presentaron una mayor expresión basal del mRNA de TNF con respecto a las poblaciones transfectadas con el siRNA control (Fig. 28B). Adicionalmente, el abatimiento de la expresión de Nur77 permaneció en los MΦ-GM

tras el estímulo con LPS, contrario a lo que ocurre en los M Φ -M (Fig. 28C). Finalmente, a pesar del incremento en el mRNA de Nur77 en los M Φ -M tratados con el siRNA de Nur77 y estimulados con LPS, la producción de TNF en respuesta a este PAMP se incrementó notablemente con respecto a lo obtenido con el siRNA control, lo que sugiere que los niveles de proteína de Nur77 podrían no haberse recuperado tras 12 h de estimulación con LPS (Fig. 28D). Por el contrario, los niveles disminuidos del mRNA de Nur77 en los M Φ -GM tras el estímulo con LPS (Fig. 3C) no tienen un reflejo importante en la producción de TNF (Fig. 28D). En conjunto, estos datos sugieren que Nur77 tendría un papel fundamental en la inhibición de la producción de TNF en respuesta a LPS sólo en los M Φ -M.

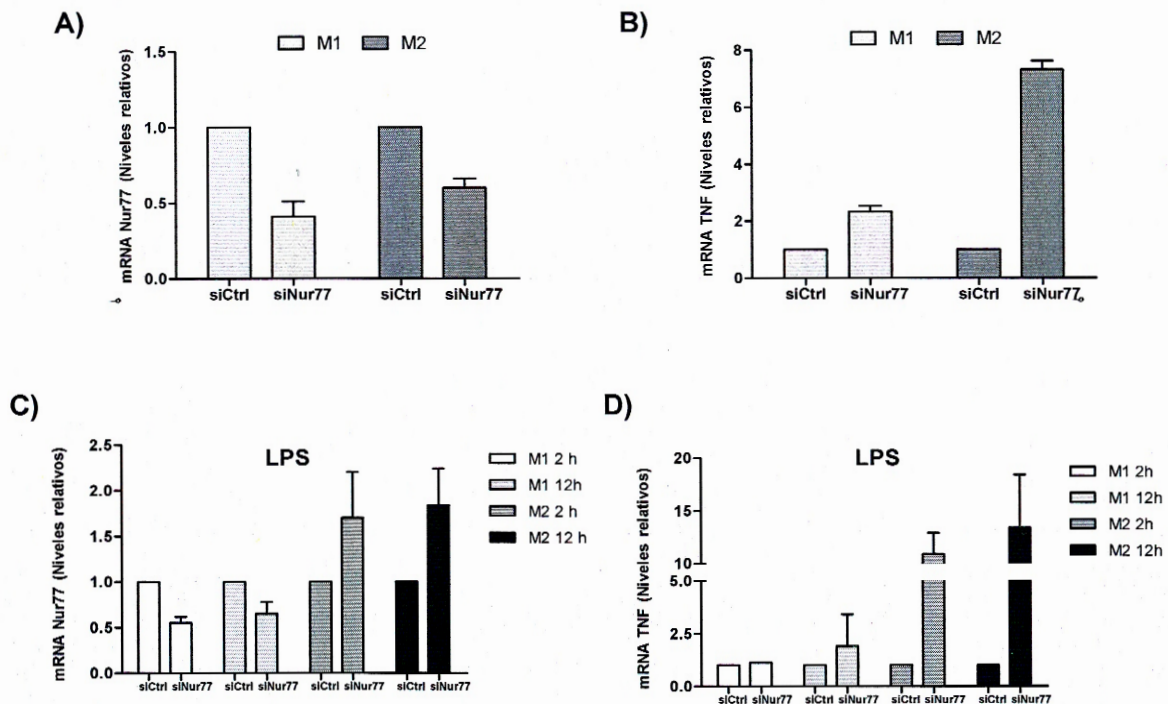


Figura 28. La disminución de la expresión de Nur77 induce un incremento en los niveles de expresión del mRNA de TNF. Los M Φ -GM y M Φ -M fueron transfectados en el cuarto día de diferenciación con un siRNA específico de Nur77 (siNur77) o un siRNA control (siCtrl) a una concentración de 50 nM. El análisis de silenciamiento se realizó 48 h después de la transfección. Expresión basal de Nur77 A) y de TNF B) en los M Φ -GM (M1) y M Φ -M (M2). C) Expresión de Nur77 en M Φ -GM y M Φ -M transfectados con siNur77 o siCtrl tras la estimulación con LPS (100 ng/mL) por 2 o 12 h. D) Expresión de TNF en los M Φ -GM y M Φ -M transfectados con siNur77 o siCtrl tras la estimulación con LPS (100 ng/mL) por 2 y 12 h. Todos los ensayos se realizaron mediante RT-qPCR y los datos se muestran relativos a los obtenidos con siCtrl. Se muestran los resultados de un donante representativo de dos analizados.

IX.- DISCUSIÓN

El estudio de la respuesta inflamatoria ha permitido la identificación de las citocinas, factores de crecimiento y tipos celulares que promueven y participan en la inflamación. Sin embargo, se encuentran sólo parcialmente descritos los mediadores de la transcripción que son activados en respuesta a las señales pro-inflamatorias y que además conllevan a la resolución de la inflamación. En este contexto, se ha atribuido a Nur77 un papel anti-inflamatorio, esto basado en los reportes donde la sobre-expresión de Nur77 en células THP-1 logra disminuir los niveles de expresión de las citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 β e IL-8 tras el estímulo con LPS o TNF, mientras que mediante el *knockdown* de Nur77 este efecto se ve revertido (31). *In vivo*, la deficiencia de Nur77 ha evidenciado las funciones anti-inflamatorias y ateroprotectoras de Nur77, dado que los ratones deficientes de Nur77 inyectados intraperitonealmente con LPS presentan una mayor sensibilidad a desarrollar sepsis (57), y que ratones ApoE $-/-$ Nur77 $-/-$ alimentados con una dieta alta en grasas presentan un incremento en las lesiones ateroscleróticas (49).

Los resultados encontrados hasta el momento en este trabajo sustentan la teoría de Nur77 como un factor anti-inflamatorio. En primer lugar, nuestro grupo de investigación ha encontrado que los M Φ -M anti-inflamatorios presentan una mayor expresión de Nur77 (transcrito y proteína) con respecto a la población de M Φ -GM pro-inflamatorios (Fig. 15 y 16). Existen reportes que proponen a Nur77 como un factor maestro de diferenciación y supervivencia de los monocitos murinos Ly6C $^-$, una población celular denominada "monocitos patrulleros" y la cual se cree que tiende a polarizar hacia M Φ de tipo M2 (58). El mismo grupo reporta que los monocitos humanos (clasificados en tres grupos con base en la expresión de CD14 y CD16), presentan una expresión diferencial de Nur77, encontrando que los monocitos CD14 $^+$ CD16 $^-$ con características pro-inflamatorias y una alta respuesta a LPS tienen una menor expresión del mRNA de Nur77, mientras que la población de CD14 dim CD16 $^+$, análoga a los monocitos Ly6C $^-$ "patrulleros", presentan una mayor expresión de Nur77 (49).

Nuestras observaciones nos han permitido detectar que todos los M Φ -M sin estimular expresan Nur77 (Fig. 17), en contraste con los M Φ -GM donde sólo una subpoblación expresa este factor. Debido a que GM-CSF induce la producción de M-CSF, proponemos que la expresión de Nur77 en los M Φ -GM podría ser el resultado del micro-ambiente presente en el medio de cultivo, y por lo tanto las células que expresan Nur77

pertenezcan a la población de M Φ -M. Estos resultados aportan una evidencia más en cuanto un probable rol de Nur77 durante la diferenciación de monocitos y M Φ con un perfil anti-inflamatorio. Con base en ello, también encontramos que los monocitos humanos CD14⁺ obtenidos de periferia no expresan Nur77, al menos a nivel proteico (Fig. 27). Sin embargo, el hecho de que Nur77 sea inducido tras los estímulos polarizantes de GM-CSF y M-CSF durante la diferenciación de monocitos a M Φ -GM y M Φ -M sugiere que Nur77 pudiera jugar un rol importante durante la diferenciación y generación de los perfiles pro- y anti-inflamatorios. Así lo demuestran los resultados de citometría obtenidos tras el estímulo con Csn-B (Fig. 21), donde disminuyen los marcadores de fenotipo M Φ -M CD163 y FR β , así como CD36, que se ha reportado disminuye su expresión cuando Nur77 es sobre-expresado (31). Estos datos sugieren que efectivamente Csn-B induce las actividades transcripcionales de Nur77.

Hasta el momento se desconocen los mecanismos por los cuales Nur77 ejerce sus efectos anti-inflamatorios. Una opción es directamente a través de su actividad transcripcional regulando la expresión de genes anti-inflamatorios o pro-inflamatorios. En este aspecto, los esfuerzos orientados a responder esta pregunta se han basado en la utilización del agonista de Nur77 Csn-B, el cual se sabe que induce las actividades transcripcionales de Nur77, además de incrementar la propia expresión de Nur77 debido a los elementos de respuesta a Nur (NBRE) presentes en su promotor (55). Los reportes que se tienen evidencian el posible papel de Nur77 regulando la expresión de ciertos genes, ya sea incrementando o disminuyendo su expresión. Al respecto, Hu *et al.* (56) reportaron que la estimulación de células THP-1 con oxLDL en presencia de Csn-B resulta en la disminución de la expresión de genes inflamatorios como IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF, proteína C reactiva (CRP), ICAM-1, VCAM-1 y NF- κ B, mientras que favorece el aumento de TGF- β y CD40 (56). Estos resultados sugieren un probable papel de Nur77 como activador o represor de estos genes. Por otro lado, Pei *et al.* (59) reportaron que un gen blanco de Nur77 es la cinasa inducible IKKi/IKK ϵ , la cual tiene como función fosforilar al factor de respuesta a interferones (IRF)-3 y mediar así la respuesta antiviral (59), lo que le atribuiría a Nur77 un papel activador de respuestas pro-inflamatorias. Nuestros resultados utilizando Csn-B como agonista de Nur77 tras la activación con LPS han evidenciado una drástica disminución en la expresión de TNF tras el estímulo con el ligando del TLR-4 LPS, el ligando de TLR-2 PGN y el ligando de TLR-3 Poli (I:C) (Fig. 20). Una posible explicación de este resultado sería a través de la activación de los dominios de transactivación de Nur77 resultando en un efecto represor sobre la expresión de TNF.

Sin embargo, no existen reportes hasta el momento que sugieran la presencia de NBRE o NurRE sobre el promotor de TNF que puedan ser reconocidos por Nur77 y ejercer así un efecto de represión. Por lo tanto, sería interesante el estudio del promotor de TNF con el objetivo de identificar estos elementos. Cabe recordar que el Csn-B, al incrementar las actividades transcripcionales de Nur77, incrementa su propia expresión, es decir que los efectos observados no son sólo debidos a la actividad transcripcional de Nur77 sino también a un incremento en su expresión. Este incremento, en conjunto con lo observado en los ensayos de localización subcelular de Nur77 (Fig. 17–19), donde la presencia de Nur77 en MΦ-GM y MΦ-M es preferentemente en el citoplasma aún después de los estímulos con LPS, oxLDL y Csn-B, nos hacen pensar que pudieran existir funciones de Nur77 que se estarían llevando a cabo en el citoplasma. Existen ya reportes en células Jurkat que sugieren una interacción de Nur77 con las subunidades de NF-κB p65 y c-Rel; las interacciones de Nur77 con p65 impiden su unión a los elementos de respuesta a NF-κB presentes en los promotores de citocinas como IL-2 e IL-8, que se ha demostrado unen preferentemente homodímeros p65 o c-Rel, o heterodímeros p65-c-Rel (60). Además, recientemente se ha demostrado que la interacción entre Nur77 y p65 disminuye la expresión de TNF, IL-6, IL-1β y óxido nítrico (57). La localización subcelular de Nur77 encontrada en nuestros resultados mantiene abierta esta posibilidad debido a que es probable que Nur77 se encuentre regulando la expresión de TNF a través de la inhibición directa sobre NF-κB, por lo que una disminución en la expresión de otras moléculas blanco de NF-κB (IL-6, IL-1β) sugeriría fuertemente que la vía que conlleva a la producción de moléculas pro-inflamatorias se ve afectada a este nivel por Nur77.

Los resultados observados tras el *knockdown* de Nur77 (Fig. 28) reafirman los efectos vistos tras la adición del Csn-B, ya que al contrario de lo que sucede tras la adición de Csn-B, los niveles de expresión basales del mRNA de TNF tras el silenciamiento de Nur77 en MΦ-GM y MΦ-M se encuentran incrementados con respecto al control, lo que sugiere que de manera normal Nur77 mantiene la expresión de TNF disminuida. Es de resaltar que la expresión del mRNA de TNF se mantiene incrementada con respecto al control tras el estímulo con LPS a las 2 y 12 h de estimulación para la población de MΦ-M, y no así para la población de MΦ-GM, donde solo a las 12 h se observa un ligero incremento en la expresión de este gen. Sin embargo, es importante mencionar que la expresión del mRNA de Nur77 en los MΦ-GM se mantiene disminuida en el *knockdown* de Nur77 aún tras los estímulos con LPS, que recordemos es un inductor de la expresión de Nur77 y que induce su expresión, mientras que en los MΦ-M pareciera ser que la

concentración de siRNA [50 nM] no es suficiente para mantener los niveles de expresión de Nur77 disminuidos tras el estímulo con LPS. Esto sugiere que la población de MΦ-M parece tener una mayor disponibilidad de los elementos en trans necesarios para iniciar la transcripción de Nur77. Esto último se asocia con los resultados observados durante la evaluación de la expresión de Nur77 durante la diferenciación de los MΦ (Fig. 27). Comparando los niveles de expresión de mRNA con respecto a los de proteína en ambas poblaciones celulares podemos sugerir que en los MΦ-GM la regulación post-transcripcional de Nur77 resulta más importante para su expresión proteica, ya que no existen grandes cambios en la expresión del mRNA desde el día tres hasta el cinco de diferenciación y sí los hay en los niveles proteicos. Por el contrario, en los MΦ-M ambas regulaciones transcripcionales y post-transcripcionales parecen ser de importancia ya que tanto el mRNA como los niveles de proteína se elevan proporcionalmente durante la diferenciación.

Como ya se ha mencionado, Nur77 ha sido propuesto como un factor ateroprotector y que además es inducido en respuesta a la oxLDL (25–31). En nuestro grupo de investigación nos encontramos actualmente realizando las pruebas necesarias para la obtención de una oxLDL que sea capaz de inducir una respuesta inflamatoria en los MΦ, ya que el utilizado en este trabajo parecía tener un nivel bajo de oxidación (datos no mostrados) y no fue capaz de inducir la síntesis de TNF en los MΦ. Sin embargo, sí pudimos observar un incremento en la expresión de Nur77 en estas células tras el tratamiento con oxLDL (Fig. 23), en concordancia con otros reportes previos (29). Hasta el momento se ha evaluado la captación de oxLDL en ambas poblaciones de MΦ (Fig. 22), encontrando que los MΦ-M presentan una mayor captación tanto de LDL como de oxLDL con respecto a los MΦ-GM, esto muy probablemente debido a la mayor expresión de receptores *scavenger* como CD36 en la población de MΦ-M. Además encontramos que la oxLDL induce la disminución en la expresión de los marcadores de superficie CD163 y FRβ en la población de MΦ-M, sugiriendo así un cambio hacia un perfil más pro-inflamatorio (Fig. 25). Este dato es muy sugerente, y nos indica que la función de Nur77 en los MΦ puede ser más compleja de lo que inicialmente estimamos. La continuación del presente trabajo incluyendo la evaluación de otros marcadores de MΦ M1 y M2, junto con el estudio de funciones adicionales de los MΦ, nos permitirán elucidar con mayor precisión las funciones que Nur77 en cada tipo de MΦ. Sin embargo, los datos obtenidos durante esta tesis nos permiten proponer a Nur77 como un factor relevante en el mantenimiento del fenotipo anti-inflamatorio de los MΦ-M, al menos a nivel funcional.

X.- CONCLUSIONES

1. Los niveles proteicos de Nur77 se encuentran incrementados en los MΦ-M con respecto a los MΦ-GM, y se correlacionan con los niveles de expresión de sus transcritos. A nivel celular, sólo una población de MΦ-GM expresa Nur77 mientras que todos los MΦ-M lo presentan, lo que sugiere una fuerte asociación de este factor de transcripción con el fenotipo anti-inflamatorio.

2. La localización de Nur77 en estado basal en ambas poblaciones de MΦ es principalmente citoplasmática, contrario a lo reportado en otros sistemas donde la localización de Nur77 es principalmente nuclear, lo que deja abierta la cuestión sobre un posible papel citoplásmico de Nur77 en nuestro sistema.

3. La inducción de la expresión de Nur77 tras el estímulo con LPS sugiere una función de este factor en la respuesta inflamatoria. Esta función estaría asociada con la resolución de la inflamación en los MΦ-GM y MΦ-M, ya que la activación de Nur77 abate la producción de TNF en respuesta a distintos PAMPs. Sin embargo, los datos del *knockdown* de Nur77 indican que esta función anti-inflamatoria sería predominante en los MΦ-M.

4. Los lípidos LDL y oxLDL inducen un cambio en el perfil fenotípico de los MΦ-M hacia un perfil pro-inflamatorio, un efecto similar al producido por el agonista de Nur77 Csn-B. Estos resultados podrían relacionar la inducción de la síntesis de Nur77 reportada para oxLDL y la activación de este factor de transcripción inducida por Csn-B, de tal manera que Nur77 estaría mediando efectos pro-inflamatorios en los MΦ a nivel fenotípico.

XI.- PERSPECTIVAS

1. Evaluar un número mayor de marcadores de polarización M1 y M2 para confirmar los datos obtenidos en esta tesis tras estimular a los MΦ con Csn-B y lípidos. Esta evaluación se llevará a cabo no sólo en los MΦ diferenciados, sino también a lo largo de su diferenciación, con el fin de analizar si estas moléculas son capaces de alterar la polarización de los MΦ dictada por GM-CSF y M-CSF.
2. Evaluar un mayor número de citocinas como IL-6, IL-1β, IFN-β (pro-inflamatorias) e IL-1RA (anti-inflamatoria) en respuesta a los PAMPs utilizados en el presente trabajo, en presencia y ausencia de Csn-B.
3. Evaluar posibles interacciones citoplasmáticas entre Nur77 y las subunidades de la familia de NF-κB [RelA (p65), RelB, c-Rel, y p50] en presencia y ausencia de Csn-B tras el estímulo con LPS, además de evaluar la localización subcelular de estas proteínas.
4. Completar el análisis de los MΦ deficientes de Nur77 en respuesta a LPS, LDL y oxLDL mediante ensayos fenotípicos y funcionales (producción de citocinas, producción de especies reactivas de oxígeno, expresión de IκB, activación de las MAPK).
5. Realizar ensayos de microarreglos de expresión comparando los transcriptomas de los MΦ deficientes de Nur77 con los MΦ silvestres.

XII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Germain P, Staels B, Dacquet C, Speddig M, Laudet V. *Overview of nomenclature of nuclear receptors*. Pharmacol. Rev. 58: 685 - 704., 2006.
2. Milbrandt J. *Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene*. Neuron 1: 183-188., 1998.
3. Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW. *Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1*. Mol. Endocrinol. 6: 2129-2135., 1992.
4. Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K. *Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family*. Biochim. Biophys. Acta. 1308: 205-214., 1996.
5. Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. *Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily*. Nat. Rev. Drug Discov. 3: 950-964., 2004.
6. Moll UM, Marchenko N and Zhang X-k. *p53 and Nur77/TR3 – transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction*. Oncogene 25: 4725-4743., 2006.
7. Paulsen RE, Weaver CA, Fahrner TJ, Milbrandt J. *Domains regulating transcriptional activity of the inducible orphan receptor NGFI-B*. J. Biol. Chem. 267: 16491-16496., 1992.
8. Wansa KD, Harris JM, Yan G, Ordentlich P, Muscat GE. *The AF-1 domain of the orphan nuclear receptor NOR-1 mediates trans-activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-metabolite 6-mercaptopurine*. J. Biol. Chem. 278: 24776 - 24790., 2003.
9. Wansa KD, Harris JM, Muscat GE. *The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment*. J. Biol. Chem. 277: 33001-33011., 2002.
10. Maxwell MA, Muscat GE. *The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles*. Nucl. Recept. Signal. 4: e002, 2005.
11. Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J. *Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast*. Science 252: 1296-1300., 1991.
12. Wilson TE, Padgett KA, Johnston M, Milbrandt J. *A genetic method for defining DNA-binding domains: application to the nuclear receptor NGFI-B*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 90: 9186-9190., 1993.
13. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J. *Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells*. Mol. Cell. Biol. 17: 5946-5951., 1997.
14. Perlmann T, Jansson L. *A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1*. Genes Dev. 9: 769-782., 1995.

15. Zetterstrom RH, Solomin L, Mitsiadis T, Olson L, Perlmann T. *Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1*. Mol. Endocrinol. 10: 1656-1666., 1996.
16. Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH, Glass CK. *A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death*. Cell 137: 47-59., 2009.
17. Campos-Melo D, Galleguillos D, Sánchez N, Gysling K, and Andrés ME. *Nur transcription factors in stress and addiction*. Frontiers in Molecular Neuroscience 6: 1-13., 2013.
18. Davis IJ, Hazel TG, Chen RH, Blenis J, Lau LF. *Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77*. Mol. Endocrinol. 7: 953-964., 1993.
19. Wingate AD, Campbell DG, Peggie M, Arthur JS. *Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation*. Biochem. J. 393: 715-724., 2006.
20. Han YH, Cao X, Lin B, Lin F, Kolluri SK, Stebbins J, Reed JC, Dawson MI, Zhang XK. *Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt*. Oncogene 25: 2974-2986., 2006.
21. Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E. *Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways*. Mol. Endocrinol. 16: 1638-1651., 2002.
22. Hirata Y, Kiuchi K, Chen HC, Milbrandt J, Guroff G. *The phosphorylation and DNA binding of the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B*. J. Biol. Chem. 268: 24808-24812., 1993.
23. Li Y, Lau LF. *Adrenocorticotrophic hormone regulates the activities of the orphan nuclear receptor Nur77 through modulation of phosphorylation*. Endocrinology 138: 4138-4146., 1997.
24. Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA. *Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77*. Nature 367: 281-284., 1994.
25. Pei L, Castrillo A, Chen M, Hoffmann A, Tontonoz P. *Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli*. J. Biol. Chem. 280: 29256-29262., 2005.
26. Pei L, Waki H, Vaitheesvaran B, Wilpitz DC, Kurland IJ, Tontonoz P. *NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism*. Nat. Med. 12: 1048-1055., 2006.

27. Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A. *Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas*. *Nature* 367: 277-281., 1994.
 28. Pei L, Castrillo A, Tontonoz P. *Regulation of macrophage inflammatory gene expression by the orphan nuclear receptor Nur77*. *Mol Endocrinol.* 20: 786-794., 2006.
 29. Shao Q, Shen L, Hu L, Pu J, Qi M, Li W, Tian F, Jing Q, He B. *Nuclear receptor Nur77 suppresses inflammatory response dependent on COX-2 in macrophages induced by oxLDL*. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49: 304-311., 2010.
 30. Bei Y, Yuan-Ying J, Shaoping C, Guijun Y and Jianxin S. *The Orphan Nuclear Receptor Nur77 Suppresses Endothelial Cell Activation Through Induction of I kBa Expression*. *Circ Res.* 104: 742-749., 2009.
 31. Bonta PI, van Tiel CM, Vos M, Pols TW, van Thienen JV, Ferreira V, Arkenbout EK, Seppen J, Spek CA, van der Poll T, Pannekoek H, de Vries CJ. *Nuclear receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid and inflammatory responses*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 2288-2294., 2006.
 32. INEGI. Estadísticas de mortalidad. [Online] 2012. http://www.inegi.org.mx/lib/olap/consulta/general_ver4/MDXQueryDatos.asp?#Regreso&c=11144,11144..
 33. Hansson GK. *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. *N. Engl. J. Med.* 352: 1685-1695., 2005.
 34. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD. *A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Circulation* 85: 391-405., 1992.
 35. Dutta, P, Courties G, Wei Y, Leuschner F, Gorbátov R, Robbins CS, Iwamoto Y, Thompson B, Carlson AL, Heidt T, Majmudar MD, Lasitschka F, Etzrodt M, Waterman P, Waring MT, Chicoine AT, van der Laan AM, Niessen HW, Piek JJ, Rubin BB, Butany J, Stone JR. *Myocardial infarction accelerates atherosclerosis*. *Nature.* 487: 325-329., 2012.
 36. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. *The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 831 - 842., 1996.
 37. Steinberg D, Witztum JL. *Lipoproteins, lipoprotein oxidation, and atherogenesis*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1999.
 38. Glass CK, Witztum JL. *Atherosclerosis: The road ahead*. *Cell* 104: 503-516., 2001.
-

39. Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, Kodama T. *Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system*. Cell. Mol. Life Sci. 54: 628-640., 1998.
40. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T. *A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection*. Nature 386: 292-296., 1997.
41. Febraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. *Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice*. J. Clin. Invest. 105: 1049-1056., 2000.
42. Maxfield FR, Tabas I. *Role of cholesterol and lipid organization in disease*. Nature 438: 612-621., 2005.
43. Ross R. *Atherosclerosis-an inflammatory disease*. N. Eng. J. Med. 340: 115-126., 1999.
44. Hansson GK. *Cell-mediated immunity in atherosclerosis*. Curr. Opin. Lipidol. 8: 301-311., 1997.
45. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B., Duez H, Fievet C., *Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis*. Circ. Res. 85: 17-24., 1999.
46. Pinderski L, Hedrick C, Olvera T, Hagenbaugh A, Territo M, Berliner J, Fyfe A. *Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19: 2847-2853., 1999.
47. Hörkkö S, Binder CJ, Shaw PX, Chang M, Silverman G, Palinski W, Witztum JL. *Immunological responses to oxidized LDL*. Free Radic. Biol. Med. 28: 1771-1779., 2000.
48. Qiagen. *LDL Oxidation in Atherogenesis*. [Online] 2013. <http://www.qiagen.com/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details.aspx?pid=267>.
49. Hanna RN, Shaked I, Hubbeling HG, Punt JA, Wu R, Herrley E, Zaugg C, Pei H, Geissmann F, Ley K, Hedrick CC. *NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis*. Circ. Res. 110: 416-427., 2012.
50. Burleigha ME, Babaevb VR, Yanceyb PG, Majorb AS, McCaleb JL, Oatesa JA. *Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE deficient and C57BL/6 mice*. J. Mol. Cell. Cardiol. 39: 443-452., 2005.
51. Akagawa KS, Komuro I, Kanazawa H, Yamazaki T, Mochida K, Kishi F. *Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages*. Respiriology. 11: S32-S36., 2006.
-

52. Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, van der Zanden L, Ottenhoff THM. *Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ and CD40L-mediated costimulation*. *Leukoc. Biol*; 79: 285-293., 2006.
53. Sierra-Filardi E, Vega MA, Sánchez-Mateos P, Corbí AL, 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.
54. Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML. *Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco) bacteria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 4560-4565., 2004.
55. Zhan Y., Du Xiping., Chen H., Liu J., Zhao B., Huang D., Li G., Xu Q., Zhang., Weimer B. C., Chen D., Cheng ., Zhang L., Li Q., Li S., Zheng Z., Song S., Huang Y., Ye Z., Su W., Lin S., Shen Y., Wu Q. *Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77*. *Nat. Chem. Biol.* 4: 548–556., 2008.
56. Hu Y., Zhang P., Yang J., Huang J., Ma X., Li S., Zhao J., Hu Y., Wang Y., Gao J., Sha Y., Zheng L., Wang Q. *Nur77 decreases Atherosclerosis Progression in ApoE $-/-$ Mice Fed a High-Fat/High-Cholesterol Diet*. *Plos one*. 9:1, 1 – 12., 2014.
57. Li L, Liu Y, Chen H, Li F, Wu J, Zhang H, He J, Xing Y, Chen Y, Wang W, Tian X, Li A, Zhang Q, Huang P, Han J, Lin T, Wu Q. *Impeding the interaction between Nur77 and p38 reduces LPS-induced inflammation*. *Nature Chemical Biology*. 1788; 339 - 346., 2015.
58. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt, JA, Geissmann F, Hedrick CC. *The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and survival of Ly6C- monocytes*. *Nat Immunol*. 8: 778–785., 2012.
59. Pei L, Castrillo A, Tontonoz P. *Regulation of Macrophage Inflammatory Gene Expression by the Orphan Nuclear Receptor Nur77*. *Mol Endocrinol*, 20(4):786–794., 2006.
60. Kurakula K, Koenis DS, M. van Tiel C, J.M. de Vries C. *NR4A nuclear receptors are orphans but not lonesome*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1843: 2543–2555., 2014.

El jurado designado por el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional aprueba la tesis que presenta para su examen final de **Maestría en Ciencias** en la especialidad de Biomedicina Molecular el **C. Eduardo Patiño Martínez**, el día 03 de Agosto de 2015.



Dra. María Carmen Sánchez Torres
Tutor



Dr. Leopoldo Santos Argumedo
Asesor



Dra. Leticia Cedillo Barrón
Asesor