



**CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“Evaluación del receptor nuclear Nurr1 como marcador de macrófagos
pro-inflamatorios humanos”**

**TESIS QUE PRESENTA:
M.G. José Ramón Muñoz Torres**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR**

**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. María Carmen Sánchez Torres**

Ciudad de México

Agosto 2019

A Dios,
A mis Padres: Evelia Torres y Noé Muñoz,
A mis Hermanos: Paola, Carlos y Violeta y
A mi Apoyo Incondicional: Alejandra.

AGRADECIMIENTOS

- Al CINVESTAV por brindarme la oportunidad de realizar la maestría en ciencias.
- Al CONACYT por el apoyo económico recibido a través del número de becario N° 632423 otorgado para los estudios de maestría.
- Al Banco de Sangre del Centro Médico Nacional “La Raza” por la donación de muestras empleadas para realizar este proyecto.
- A la Dra. Carmen Sánchez por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su tiempo, por ayudarme a crecer profesionalmente, por su entrega y sobre todo su confianza.
- A mis Co-Tutores: Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete y el Dr. Michael Schnoor por su orientación y consejos para realizar este proyecto de la mejor forma.
- A todos los profesores del Departamento de Biomedicina Molecular por haber colaborado importantemente en mi desarrollo académico.
- A la Dra. Paloma Sánchez-Mateos por abrirme las puertas de su laboratorio, proporcionarme los insumos, tiempo, consejos y enseñanzas para realizar este proyecto.
- Al Dr. Rafael Samaniego por su tiempo, consejos y enseñanzas del uso de microscopio Confocal.
- A mis padres por su apoyo incondicional, amor y por estar siempre para mí pase lo que pase.
- A mis hermanos y familiares por su apoyo y cariño.
- A novia Alejandra Montañez por estar siempre conmigo, ayudarme, apoyarme, alentarme, por su cariño, por su amor, por ser ese gran pilar en lo personal y en lo profesional, simplemente por ser mi todo.
- A mis compañeros del laboratorio (CST) José Luis, Angélica, Eduardo y Miguel por todos los buenos momentos, enseñanzas, consejos, experiencias juntos y sobre todo por su amistad.
- A mis compañeros del laboratorio de HGUGM (PSM) Alba, Elena y sobre todo a Sara que desde el primer día en el laboratorio me brindo todo su apoyo, ayuda y sobre todo su amistad.
- A la Dra. Amaya, Julia y Raquel del laboratorio HGUGM por su invaluable apoyo y asesoría en el desarrollo de las metodologías de este proyecto.
- A mis compañeros de generación por estar conmigo en muchos de los mejores momentos de mi vida académica.
- A la Dra. Norma Cristina Segovia Gamboa por su enseñanza y asesoría en el desarrollo de metodologías.
- A María de Jesús Maqueda Villegas y Ninfa Arreola Gómez por su invaluable trabajo secretarial.
- A Julio César Ramírez Gómez por todo el apoyo técnico brindado.

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 Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; parte del trabajo de microscopía confocal de tejidos de pacientes con Pénfigo se realizó en el laboratorio de Inmuno-Oncología de la Dra. Paloma Sánchez Mateos Rubio, en el Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” de Madrid, España.

COMITÉ TUTORIAL

Directora de tesis:

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Asesores:

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Michael Schnoor

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

El C. José Ramón Muñoz Torres realizó esta tesis de maestría con una beca otorgada por CONACYT (N°632423)

INDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | 1 |
| RESUMEN EN ESPAÑOL | 3 |
| RESUMEN EN INGLÉS | 5 |
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| 1 Características de los macrófagos. | 6 |
| 1.1 Polarización de macrófagos hacia el fenotipo M1 y M2. | 7 |
| 1.2 Los macrófagos como células clave en los procesos inflamatorios. | 8 |
| 1.3 Características de procesos inflamatorios. | 8 |
| 2 Enfermedades inflamatorias autoinmunes de la piel. | 9 |
| 2.1 Macrófagos y células inflamatorias en enfermedades ampollasas. | 10 |
| 3 Características de los receptores nucleares. | 11 |
| 4 Características de la familia de receptores nucleares NR4A. | 12 |
| 4.1 Receptores nucleares NR4A en el proceso inflamatorio. | 14 |
| 4.2 Nurr1 en procesos pro-inflamatorios. | 15 |
| 4.3 Papel anti-inflamatorio. | 16 |
| 4.4 Nurr1 en patologías. | 17 |
| ANTECEDENTES DIRECTOS | 18 |
| JUSTIFICACIÓN | 20 |
| HIPÓTESIS | 20 |
| OBJETIVOS | 21 |
| OBJETIVO GENERAL | 21 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 21 |
| METODOLOGÍA | 22 |
| 1 Aislamiento y purificación de monocitos. | 22 |
| 2 Generación de macrófagos de tipo M1 y M2. | 22 |
| 3 Determinación de la expresión de Nurr1 durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos. | 22 |
| 4 Determinación de los factores que inducen o suprimen la expresión de Nurr1 en la diferenciación de monocitos a macrófagos. | 23 |
| 5 Ensayos de Western blot. | 24 |
| 6 Inmunofluorescencia de macrófagos <i>in vitro</i>. | 25 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5 | Inmunofluorescencia de cortes de biopsias de pacientes con penfigoide ampolloso. | 25 |
| 6 | Análisis estadístico. | 27 |
| | RESULTADOS | 28 |
| | Nurr1 se expresa preferentemente en los macrófagos M1 durante el proceso de diferenciación. | 28 |
| | Estímulos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios promueven cambios diferenciales en la expresión de Nurr1 en los macrófagos M1 y M2. | 29 |
| | Relocalización subcelular de Nurr1 tras el estímulo con PGE₂. | 30 |
| | Expresión de Nurr1 en muestras de piel de pacientes con pénfigo ampolloso. | 34 |
| | DISCUSIÓN | 38 |
| | CONCLUSIONES | 43 |
| | PERSPECTIVAS | 44 |
| | REFERENCIAS | 45 |

ABREVIATURAS

AP-1: Proteína activadora 1

CD: Cluster de diferenciación

COX: ciclooxigenasa

DBD: Dominio de unión a DNA

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

GM-M ϕ : Macrófagos pro-inflamatorios generados con GM-CSF

IFN: Interferón

IL: Interleucina

iNOS: Sintasa inducible de óxido nítrico

LBD: Dominio de unión a ligando

LPS: Lipopolisacarido

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos.

M-M ϕ : Macrófagos anti-inflamatorios generados con M-CSF

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos

M ϕ : Macrófagos

MMP: Metaloproteasas de matriz

NES: Secuencia de exportación nuclear

NF: Factor nuclear

NLS: Secuencia de localización nuclear

NR: Receptor nuclear

NR4A: Receptor nuclear grupo 4 clase A

PA: Pénfigo ampolloso

PGE₂: Prostaglandina E₂

PI3K: Fosfatidil inositol-3 cinasa.

PK: Proteína cinasa

PV: Pénfigo vulgar

RXR: Receptor de retinoide X

TGF: Factor de crecimiento transformante

TNF: Factor de necrosis tumoral

RESUMEN EN ESPAÑOL

Los macrófagos (M ϕ) son células del sistema inmune innato que tienen un papel central en el desarrollo y control de procesos inflamatorios. Se ha demostrado su participación en el combate y progreso de diferentes enfermedades según el tipo de activación que reciban. Una activación clásica genera M ϕ M1 pro-inflamatorios, capaces de eliminar patógenos y células tumorales; la activación alternativa produce M ϕ M2 anti-inflamatorias, inmunosupresores y pro-tumorales. Los fenotipos de los M ϕ cambian de acuerdo a las fases del proceso inflamatorio. Se ha comprobado que alteraciones en el cambio de fenotipo M1 a M2 puede causar estímulos inflamatorios persistentes que propician la aparición de múltiples enfermedades. Actualmente se conocen muy pocos marcadores que distingan los diferentes fenotipos de M ϕ . Por medio de ensayos de microarreglos de expresión identificamos genes expresados diferencialmente en M ϕ generados *in vitro* con GM-CSF y M-CSF a partir de monocitos CD14+, para originar M ϕ M1 (pro-inflamatorios) y M2 (anti-inflamatorios), respectivamente. Dentro de los genes identificamos el receptor nuclear NR4A2, que codifica el factor de transcripción Nurr1, el cual está implicado en procesos como supervivencia y diferenciación celular, metabolismo, e inflamación. En este trabajo analizamos la expresión de Nurr1 en función del fenotipo pro- o anti-inflamatorio de los M ϕ . La expresión de Nurr1 no se detectó en los precursores monocíticos CD14+, pero se indujo durante el proceso de diferenciación con GM-CSF y M-CSF, aunque sólo de forma estable en los M ϕ M1. Además identificamos que IL-4, IFN- β , TGF- β 1 y TNF fueron inductores de la proteína en estos M ϕ . Se ha descrito que la localización de Nurr1 es importante para llevar a cabo sus funciones. Nosotros demostramos que Nurr1 cambia de compartimento subcelular en respuesta al estímulo con PGE₂ en los M ϕ M1 y M2 de forma diferencial. Finalmente, en muestras de piel de pacientes con pénfigo ampoloso se observó un mayor infiltrado de M ϕ dérmicos con características pro-inflamatorias reflejadas en la menor expresión de CD163L1 y mayor

expresión de TNF y Nurr1, en comparación con los M ϕ de la piel de donantes sanos. Estos resultados identifican al receptor nuclear Nurr1 asociado con los M ϕ pro-inflamatorios *in vivo* e *in vitro*, siendo un marcador potencial de este fenotipo.

RESUMEN EN INGLÉS

Macrophages (M ϕ) are innate immune system cells which have a central role in the development and control of inflammatory processes. Their participation in the combat and progression of different diseases has been demonstrated according to the type of activation that they receive. While the classic activation generates pro-inflammatory (M1) M ϕ , capable of pathogen and cancer cells eradication, the alternative activation produces anti-inflammatory (M2) M ϕ , which have immunoregulatory and tumor promoter abilities. The M ϕ phenotypes change according to the inflammatory process phases. It has been demonstrated that a fail in the phenotypic switch from M1 to M2 may cause inflammatory persistent stimulation of many illnesses. Very few markers are currently known that allow us to distinguish the different phenotypes of human M ϕ . From microarrays, we identified genes that were differentially expressed on pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) M ϕ , generated *in vitro* from human monocytes CD14+ stimulated with GM-CSF and M-CSF, respectively. Within the identified genes, the nuclear receptor *NR4A2* caught our attention since it coded for the transcription factor Nurr1, which is involved in cell survival and differentiation, metabolism, and inflammatory processes. The present study was design to analyze the expression of the nuclear receptor Nurr1 in pro-inflammatory and anti-inflammatory M ϕ . Nurr1 expression was not detected in blood monocytes, but it was induced during the differentiation process in GM-CSF- and M-CSF-derived M ϕ ; however, the protein was induced in a stable manner only in M1 M ϕ . Additionally, we identified IL-4, IFN- β , TGF- β 1 and TNF as Nurr1 inducers in M1 M ϕ . It has been described that Nurr1 localization is important to perform its functions. We demonstrated that Nurr1 differentially changes its subcellular localization in M1 and M2 M ϕ upon stimulation with PGE₂. Finally, in skin samples from patients of bullous pemphigoid we detected an increased M ϕ macrophage infiltrate compared with samples from healthy donors. Those M ϕ had pro-inflammatory characteristics reflected in the lower expression of CD163L1 and greater expression of TNF and Nurr1 with respect to resident M ϕ found in the healthy skin. These results identified the nuclear receptor Nurr1 in association with pro-inflammatory M ϕ *in vitro* and *in vivo*, thus it could be a potential marker of this phenotype.

INTRODUCCIÓN

1 Características de los macrófagos.

Los macrófagos ($M\phi$) son células del sistema inmune, específicamente del sistema inmune innato, que poseen múltiples funciones en los diferentes tejidos, a través de una gran heterogeneidad de fenotipos y funciones de los mismos. Son parte del sistema fagocítico mononuclear, junto con las células dendríticas; estas células poseen la capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T, pero también de subdividirse en subpoblaciones en diferentes regiones anatómicas¹. Las funciones de los $M\phi$ son claves para preservar la homeostasis, al igual que el resto de las células del sistema inmune innato son la primera línea de defensa y por tanto tienen la capacidad de protegernos contra microorganismos potencialmente patógenos y células tumorales. Se consideran células cruciales en la modulación y efecto de la respuesta de otras células del sistema inmune, como lo hacen al influir en la respuesta inmune adaptativa, dado que su activación influye en la respuesta y función de células como los linfocitos. La forma en que los $M\phi$ influyen en la respuesta de los linfocitos puede ser a través de mecanismos como: contacto célula-célula, la producción de diversos estímulos (citocinas, quimiocinas, radicales libres, metabolitos del ácido araquidónico, etc.) Por ello tienen un papel central en el inicio, perpetuación y resolución de procesos inflamatorios. Los $M\phi$ llevan a cabo sus funciones en el proceso inflamatorio cuando llegan al sitio de lesión, identifican diversos estímulos presentes en el microambiente del tejido dañado y dentro de sus capacidades están el reclutar más leucocitos al sitio de lesión^{2,3,4}.

Los monocitos presentes en sangre periférica representa del 5-10% de los leucocitos totales y se sabe que estas células pueden extravasarse a los diferentes tejidos y repoblar continuamente a células dendríticas y $M\phi$ ⁵, como respuesta inicial de un microambiente inflamatorio agudo los $M\phi$ adquieren

funciones M1 (pro-inflamatorias) y al término del proceso inflamatorio adquieren funciones M2 (anti-inflamatorias)⁸.

1.1 Polarización de macrófagos hacia los fenotipos M1 y M2.

Los M ϕ se han clasificado según su tipo de activación. La activación clásica (pro-inflamatoria) es el resultado del estímulo con citocinas de tipo Th1 [factor de necrosis tumoral (TNF), interferón (IFN)- γ , factor estimulante de colonias de granulocitos-M ϕ (GM-CSF)] o por estructuras derivadas de patógenos (lipolisacárido bacteriano, LPS), mientras que la activación alternativa (anti-inflamatoria) es generada por estímulos con citocinas Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) o factores inmunosupresores [interleucina (IL)-10, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), glucocorticoides]. El primer tipo de M ϕ se caracteriza por generar respuestas inflamatorias de tipo 1, eliminar patógenos intracelulares y células tumorales, mientras que los segundos se distinguen por favorecer la respuesta inflamatoria de tipo 2 relacionada con alergias, eliminación de parásitos, inmunoregulación y remodelación tisular^{2,3,7}.

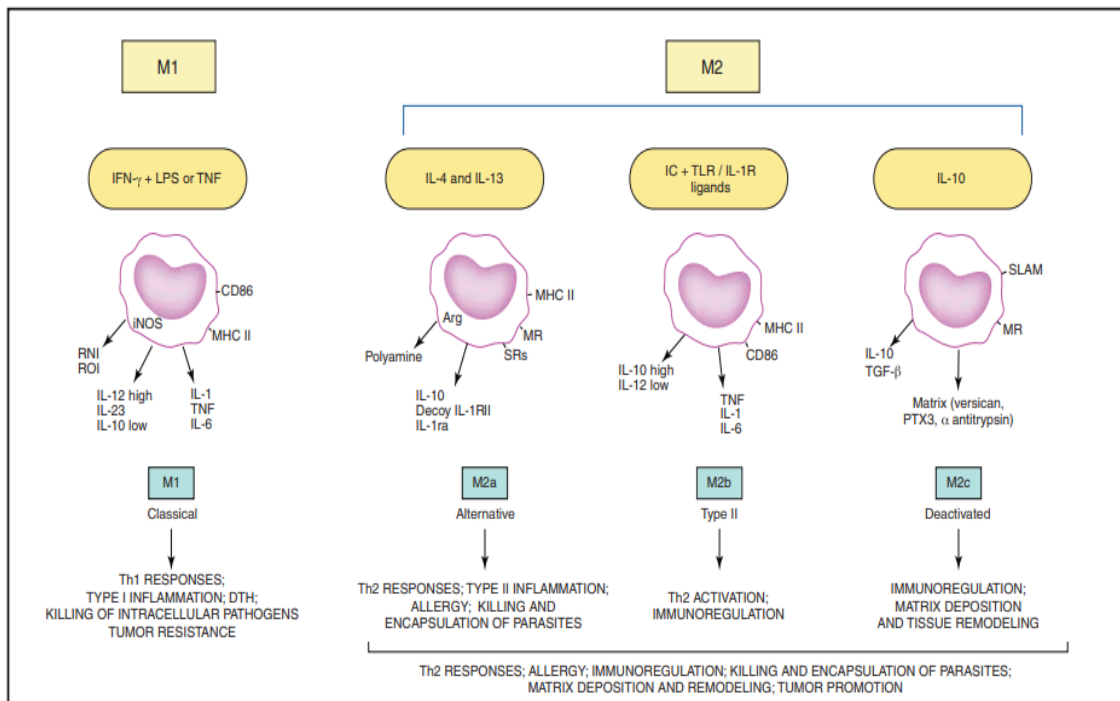


Figura 1. Inductores de la polarización de macrófagos y las características de cada uno de los fenotipos (M1 y M2). Tomada de Martínez and Gordon, 2014³.

1.2 Los macrófagos como células clave en los procesos inflamatorios.

Los M ϕ M1 se caracterizan por ser los principales responsables del inicio y perpetuación del proceso inflamatorio. Están asociados con la secreción de altos niveles de citocinas pro-inflamatorias y polarizantes (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23), tiene capacidad microbicida y tumoricida, y favorecen las respuestas de linfocitos Th1 y Th17 en defensa contra patógenos intracelulares. Después de un periodo agudo de inflamación los M ϕ sufren un cambio en el tipo de citocinas secretadas, y cambian de un perfil M1 a uno M2⁸. Los M ϕ M2 están implicados en la resolución del proceso inflamatorio, eliminación de células dañadas, reparación tisular activando la vía de la arginasa, síntesis de colágeno y poliaminas, proliferación y crecimiento celular (endotelios vasculares y fibroblastos). Modulan la respuesta linfocitaria Th2 implicada en la defensa contra parásitos. Además secretan citocinas anti-inflamatorias [IL-10, antagonista del receptor de IL-1 (IL-R1a)] y factores de crecimiento (PDGF, FGF, VEGF) que ayudan a reparar tejidos y a recuperar la homeostasis tisular^{2,9}. Por otro lado se sabe que al presentarse fallas en el switch fenotípico de los M ϕ entre el fenotipo M1 y M2, junto con anomalías en la producción de mediadores resolutivos de la inflamación, infiltrado de células supresoras mieloides, entre otros mecanismos, se favorece la inflamación aguda y crónica por periodos prolongados, implicando una reiniciación continua del proceso inflamatorio¹⁰.

1.3 Características de los procesos inflamatorios.

La inflamación es una respuesta biológica adaptativa de tejidos vascularizados que se activa ante una infección, lesión tisular, toxinas y autoinmunidad. Es un mecanismo protector, que se activa con el objetivo de eliminar el agente que causa el daño celular (bacteria, toxina, células necróticas, etc.), para recuperar la homeostasis tisular. Es altamente heterogénea y se puede clasificar como: aguda o crónica y local o sistémica. Clínicamente es reconocida por: rubor, tumor, calor y dolor^{11,12}.

Los procesos inflamatorios se caracterizan por activación de varias vías de señalización como: la del factor nuclear (NF)- κ B, la proteína activadora (AP)-1, factores reguladores de interferón (IRF), fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3K), cinasas activadas por mitogenos (MAPK), etc. Su activación promueve el reclutamiento de leucocitos a las zonas de inflamación a través de la secreción de mediadores. Estos mediadores incluyen citocinas, quimiocinas, lípidos (prostanoides, leucotrienos), moléculas de adhesión, metaloproteasas de matriz (MMP), y enzimas implicadas en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [ej: NADPH oxidasas y sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS)].^{13,14,15,16}.

Cuando el proceso inflamatorio no se resuelve o se perpetua, se favorece la coexistencia de un proceso de autoinmunidad, debido a una respuesta anormal de mecanismos que inducen, mantienen, controlan o eliminan el proceso de inflamación. Así mismo se ha comprobado la contribución de éstos a la patogénesis de enfermedades inflamatorias y autoinmunes¹⁰.

2 Enfermedades inflamatorias autoinmunes de la piel.

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por presentar procesos inflamatorios y degeneración de tejidos. Pueden tener implicación sistémica o ser específicas de órgano. En México se tiene sólo información parcial sobre la epidemiología de estas enfermedades, aunque se acepta que el 10% de la población padece algún tipo de enfermedad autoinmune. El Instituto Mexicano del Seguro Social estima que del 6 al 8% del total de su consulta médica acude por padecimientos autoinmunes^{17,18}.

Las enfermedades ampollas son enfermedades autoinmunes, específicas de órgano, generadas por una respuesta de auto-anticuerpos contra proteínas de unión célula-célula o célula-matriz en piel y mucosas. Estas enfermedades se dividen en 2 grandes grupos, las que generan ampollas intra-epiteliales (pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo y otros subtipos de pénfigo) y las que generan ampollas subepiteliales (pénfigo ampolloso, dermatitis herpetiforme, herpes

gestacional, penfigoide membranoso de mucosas, dermatitis por depósito lineal de IgA, epidermólisis ampollosa y lupus ampolloso)¹⁹. De estas enfermedades las más comunes son el pénfigo ampolloso y el pénfigo vulgar.

En el pénfigo vulgar (PV) se presentan ampollas intraepidérmicas en piel y mucosas originadas por la separación de las uniones célula-célula a través de un proceso llamado acantólisis²⁰. La acantólisis es el resultado de la inhibición de la función de las desmogleínas por auto-anticuerpos de forma directa o indirecta. La evolución es aguda, subaguda o crónica, y letal en ausencia de tratamiento. Aparece en pacientes de mediana edad, y afecta igualmente a hombres y mujeres. La frecuencia varía de 0.5 a 3.2 por 100,000 habitantes por año²¹. Se caracteriza por la presencia en suero, piel y mucosas de auto-anticuerpos IgG dirigidos contra desmogleína 1 y la desmogleína 3¹⁹, dos glicoproteínas transmembranales que intervienen en la adhesión intercelular y en la señalización entre células epidérmicas.

El penfigoide ampolloso (PA) presenta una prevalencia de 1 en 40,000, y una incidencia anual de 1 en 150,000 (en Francia y Alemania). Se presenta normalmente en pacientes mayores de 60 años, aunque también puede presentarse en niños. Se caracteriza clínicamente por ampollas tensas, con contenido claro, que se desarrollan en el borde de placas eritematosas y presentan escozor intenso. En infantes ocurre dentro del primer año de vida, con ampollas tensas en piel eritematosa o piel acra normal. Se han identificado auto-anticuerpos IgG dirigidos contra las proteínas BPAG1 o BP230, y BPAG2 (o BP180 o colágeno XVII) presentes en los hemidesmosomas de la zona de unión dermo-epidérmica. La unión de los auto-anticuerpos activa el complemento y favorece la aparición de ampollas subepidérmicas²².

2.1 Macrófagos y células inflamatorias en enfermedades ampollosas.

Se ha reportado la aparición de epidermólisis ampollosa adquirida posterior a la administración de GM-CSF, lo que sugiere que la actividad de los granulocitos y/o de los M ϕ es importante para la generación de las lesiones²².

Los M ϕ que expresan el marcador *scavenger* CD163 se encuentran de manera muy abundante tanto en las lesiones tanto de PV como de PA²³. Se ha descrito que estos M ϕ presentan un perfil anti-inflamatorio o M2, y esta característica es más evidente en PA que en PV²⁴. Estas enfermedades presentan diferentes grados de inflamación en la piel. En lesiones tempranas se encuentra un infiltrado de células inflamatorias a nivel perivascular y subepidermal. Dentro de las células inflamatorias infiltradas se encuentran los eosinófilos, que producen enzimas como metaloproteasas, o los linfocitos T que producen citocinas como IFN- γ , TNF, IL-2, -4, -6 y -13 y que contribuyen a la formación de las ampollas. Los neutrófilos son las células más abundantes del infiltrado, probablemente por el gran contenido de IL-8 que pudiera ser liberado por los queratinocitos. También se ha visto que las células T cooperadoras activadas se encuentran en mayor proporción en la piel de estos pacientes comparada con la de personas sanas. Estos linfocitos expresan HLA-DR y están en estrecha asociación con las células de Langerhans de la piel, sugiriendo que éstas son las mediadoras del proceso inflamatorio^{23,24}. Por otro lado, se sabe que todas estas células durante el proceso inflamatorio pueden inducir la transcripción de genes que perpetúan, controlan o terminan el proceso inflamatorio, para asegurar la reparación del tejido y la restauración de la homeostasis tisular²⁵.

3 Características de los receptores nucleares.

Los receptores nucleares (NR) son factores de transcripción que modulan la expresión de diferentes genes implicados en diferenciación, proliferación crecimiento celular, metabolismo, apoptosis y otras funciones fisiológicas que favorecen el mantenimiento de la homeostasis tisular. Los receptores nucleares constituyen una superfamilia de moléculas compuesta por 48 factores de transcripción (TF) en humanos. La expresión de los NR es dependiente del tipo de tejido y contexto celular. Varios miembros de esta familia son activados por ligandos, como los receptores activados por el

proliferador de peroxisomas, el receptor de glucocorticoides, el receptor de retinoide X (RXR), hormonas tiroideas, receptor de vitamina D, entre otros^{35,36,37}.

De acuerdo a las características de los ligandos los NR se clasifican en 6 grupos (grupo 1: receptores de la hormona tiroidea; grupo 2: receptores de retinoide X; grupo 3: receptores esteroideos; grupos 4, 5 y 6: NR “huérfanos”, para los cuales no se han descrito ligandos)²⁷. Dentro de estos NR “huérfanos” se encuentra la familia de receptores NR4A que ha sido asociada recientemente con varios aspectos de los procesos inflamatorios, por lo que constituyen un área de investigación activa para el desarrollo de estrategias terapéuticas contra un amplio rango de enfermedades inflamatorias, como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome metabólico, cáncer, o aterosclerosis²⁶. La modulación de la actividad de los NR4A ha demostrado ser beneficiosa en modelos animales de diabetes²⁸ y de aterosclerosis²⁹. La familia NR4A está compuesta por tres miembros: Nur77 (codificado por el gen *NR4A1*), Nurr1 (*NR4A2*) y NOR-1 (*NR4A3*)³⁰. Los tres se expresan predominantemente en tejidos como músculo esquelético, hígado y tejido adiposo, así como en células del sistema nervioso, músculo liso y endotelios vasculares³¹. También se ha demostrado su expresión en células del sistema inmunitario, y han sido especialmente estudiados en los Mφ, células dendríticas y linfocitos T.

4 Características de la familia de receptores nucleares NR4A.

Los receptores NR4A presentan un dominio de transactivación en la región N-terminal (AF-1), un dominio central de unión a DNA (DBD), y un dominio de unión a ligando (LBD) que contiene un dominio de transactivación dependiente de ligando en su extremo C-terminal (AF-2)³². El LBD tiene una estructura atípica, y hasta el momento no se han descrito ligandos endógenos, por lo que se considera que estos NR están constitutivamente activos y que actúan independientemente de ligando. Se han descrito secuencia de localización

nuclear (NLS) presentes en el dominio de unión a DNA, mientras que las secuencias de exportación nuclear (NES) se han identificado en el dominio de unión a ligando. Ambas tienen la capacidad de modificar la localización de los NR4A a nivel nuclear y citoplásmico. Tanto el importe como el exporte nuclear se consideran mecanismos de regulación de estos receptores nucleares, ya que las diferentes funciones que realizan dependen de su localización. Las proteínas descritas hasta ahora que regulan la localización nuclear de los receptores NR4A son calreticulina y exportina 1 (*Chromosomal Maintenance 1*, CRM-1), mientras que la proteína de choque térmico HSP70 tiene la capacidad de retener a los receptores nucleares en citoplasma^{27,80,83}.

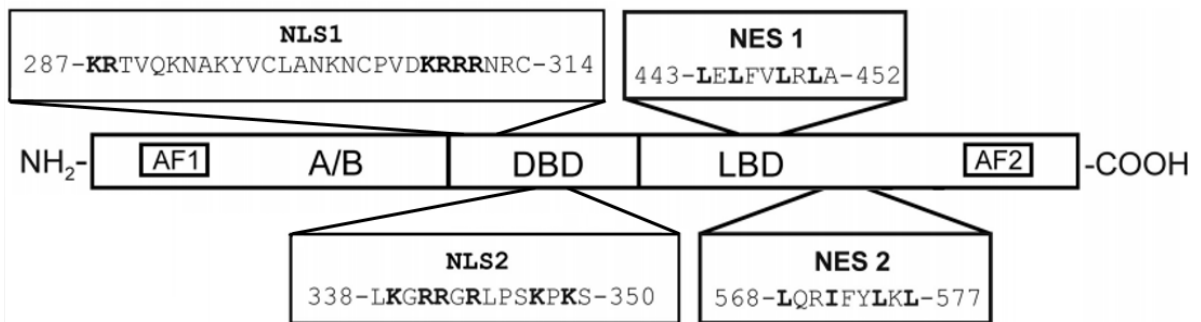


Figura 2. Estructura del receptor nuclear NR4A2. Se representan algunos sitios de NLS en el dominio de unión a DNA (DBD) y los sitios de NES en el dominio de unión a ligando (LBD). Tomada y modificada de Garcia-Yagüe Á, Rada P, Rojo A, Lastres-Becker I, Cuadrado A, 2013.

Se han descrito algunas moléculas que pueden unirse al LBD y actuar como agonistas o antagonistas de los NR4A, como el fármaco anti-neoplásico 6-mercaptopurina o el octaquétido cytosporone B (CsnB)³³. Estos factores de transcripción pueden activar la transcripción de sus genes blanco en forma monomérica, homodimérica y heterodimérica. Como heterodímeros pueden formar complejos con otros factores de su misma familia o con otros receptores nucleares. Los monómeros se unen a los elementos de respuesta NBRE (AAAGGTCA), mientras que los homodímeros y los heterodímeros formados entre los miembros de la familia NR4A se unen al elemento de respuesta a

Nurr (NurRE, TGATATTTn6AAATGCCA)^{34,35,36}. Además, Nur77 y Nurr1 pueden formar heterodímeros con RXR y activar la transcripción a través del elemento de respuesta DR-5³⁶.

Los NR4A puede activar o reprimir la transcripción génica a través de su unión a moléculas co-activadoras con actividad de acetil-transferasa de histonas (SRC-1 y -2, p300) o a complejos co-represores con actividad desacetilasa y demetilasa de histonas (ej: LSD1, SMRT, CoREST, HDAC1)^{37,38}. Además, los NR4A pueden regular la expresión génica a través de mecanismos de “transrepresión”, interfiriendo con varias vías de señalización. La actividad de los receptores NR4A se ha asociado con diversos procesos fisiológicos como la inflamación, el metabolismo de lípidos y carbohidratos, y la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Sin embargo su actividad es compleja, y parece depender del contexto celular evaluado^{37,39}.

4.1 Receptores nucleares NR4A en el proceso inflamatorio.

La expresión basal de los NR4A es baja, y está regulada por una gran variedad señales extracelulares como factores de crecimiento [epidérmico (EGF), derivado de plaquetas (PDGF)], aminas biogénicas (histamina, serotonina), y estímulos inflamatorios (LPS, TNF, lípidos oxidados). Su transcripción está mediada por varias vías de señalización: proteína cinasa (PK)A, PKC, proteínas G heterotriméricas, PI3K, NF-κB y AP-1^{31,39,40}. La regulación de la expresión de los receptores NR4A se produce a nivel transcripcional, transduccional y post-transduccional. En respuesta a estímulos inflamatorios, los genes *NR4A* se transcriben rápidamente, y forman parte de los genes de respuesta "temprana inmediata"³⁹. La expresión y función de los NR4A está regulada también por fosforilaciones y SUMOilaciones, y ambas pueden conllevar un decremento o un incremento en la actividad de estas moléculas^{37,39}.

La mayoría de los estudios encaminados a la identificación de los genes regulados por los receptores NR4A se han basado en el análisis de ratones deficientes de los mismos y en sistemas experimentales que implican su

sobre-expresión en líneas celulares. Sin embargo, los resultados obtenidos no son siempre consistentes⁴⁸, debido en parte a los diferentes contextos celulares evaluados. Por ejemplo, la concentración intracelular de Nurr1 parece afectar el patrón de transcritos que regula⁴⁸, por lo que es posible que los ensayos que modulan artificialmente su expresión reflejen sólo una realidad parcial de su actividad. Los receptores NR4A fueron descritos inicialmente como factores con una función pro-inflamatoria^{40,49}.

Todos son regulados por estímulos inflamatorios y su expresión se induce en tejidos con patologías inflamatorias (tejido sinovial de individuos con RA, cáncer colo-rectal, psoriasis, lesiones ateroscleróticas, esclerosis múltiple)^{50,51,52,53,54}. Sin embargo, estudios posteriores han sugerido que los receptores nucleares NR4A pueden actuar como activadores o represores de las respuestas inflamatorias^{62,64}.

4.2 Papel de Nurr1 en procesos inflamatorios.

Cuando Nurr1 se sobre-expresa en células sinoviales humanas incrementa la expresión constitutiva e inducible por TNF de la quimiocina inflamatoria IL-8^{56,57}. En este último caso Nurr1 forma complejos con la subunidad de NF- κ B p65 que inducen la transcripción de *IL8*⁵⁷. En este mismo sistema Nurr1 incrementa la síntesis de MMP13 en respuesta a TNF, mientras que disminuye la expresión del inhibidor de MMPs TIMP-2⁵⁷. En células de endotelio microvascular humano Nurr1 incrementa la expresión de moléculas inflamatorias como IL-1 β , ICAM-1 y GM-CSF en condiciones de privación de oxígeno y glucosa⁵⁸. Se ha demostrado que Nurr1 tiene funciones en la regulación de los linfocitos T, M ϕ y fibroblastos. Además es un potente mediador de señales inflamatorias en los M ϕ y su expresión es necesaria para el cambio fenotípico M1/M2⁶⁴.

4.3 Papel anti-inflamatorio de Nurr1.

Se ha puesto de manifiesto en varios tipos celulares como M ϕ , células endoteliales, células de músculo liso, o fibroblastos. En células estimuladas con LPS, TNF, o lípidos oxidados, la sobre-expresión de los NR4A suprime la inducción de factores como TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2, MIP-1 α y -1 β , iNOS, y ciclooxigenasa (COX)-2, por lo que estos receptores se consideran moléculas “desactivadoras” de los M ϕ ^{45,51,60,61}. Su actividad también disminuye la expresión de ICAM-1 y VCAM-1⁵⁴, y podrían inhibir los procesos de extravasación de leucocitos a los tejidos.

En fibroblastos sinoviales Nurr1 inhibe la síntesis de genes que codifican para MMPs^{57,62} y osteopontina⁶³, lo que sugiere un papel protector de este receptor en la inflamación y destrucción de las articulaciones. Nurr1 inhibe los procesos inflamatorios al promover la polarización de los M ϕ hacia el fenotipo anti-inflamatorio M2. La sobre-expresión de Nurr1 en M ϕ de ratón derivados de médula ósea incrementa la expresión de genes relacionados con el fenotipo M2 (*il10*, *Arg1* -arginasa 1-, *Ym1* -quitinasa 3 tipo 3-)⁶⁴. Estos fenotipos de M ϕ han sido relacionados con algunas enfermedades. Además, la transferencia de M ϕ que sobre-expresan Nurr1 en un modelo de sepsis inducida por LPS incrementa la supervivencia de los ratones⁶⁴. En humanos no se ha estudiado la asociación de Nurr1 con la polarización de los M ϕ . Los efectos pro- y anti-inflamatorios de los receptores NR4A se han atribuido fundamentalmente a su interacción con NF- κ B p65. Esta interacción depende de la fosforilación de p65 por la cinasa de la glucógeno sintasa (GSK)3 β en microglía⁴⁵. El heterodímero Nurr1-p65 puede unirse a los promotores de genes inflamatorios y activar⁵⁶ o inhibir⁴⁵ su transcripción. En ambos casos la actividad de Nurr1 no depende de su unión al DNA. Los mecanismos de activación no están bien esclarecidos. Los mecanismos de represión génica dependen del reclutamiento de complejos co-represores como CoREST⁴⁵. La asociación Nurr1-CoREST promueve la liberación de p65 de los promotores de sus genes blanco y la disminución subsecuente de la respuesta inflamatoria⁶⁵.

4.4 Nurr1 en patologías.

Se ha observado que los niveles de Nurr1 están incrementados en la piel de pacientes con psoriasis, mientras que en la piel de donantes sanos se expresa de forma disminuida, tanto a nivel de mRNA como en proteína. La expresión de Nurr1 está aumentada a nivel nuclear en la capa basal y suprabasal de la epidermis de pacientes con psoriasis; además, co-localiza con el antígeno Ki-67, lo que sugiere su participación en la proliferación anormal de los queratinocitos, induciendo hiperplasia epidérmica. Hay una distribución diferencial entre el citoplasma y el núcleo, sugiriendo que su translocación al núcleo regula el proceso de proliferación⁵³. Se ha observado la participación de Nurr1 en el proceso inflamatorio que conlleva la artritis reumatoide. Su elevada expresión en tejido sinovial y sinoviocitos primarios está relacionada con el incremento de la proliferación y migración de éstos, produciendo inflamación del tejido cartilaginoso^{50,56,57}.

Se ha observado la sobre-expresión de Nurr1 en el inicio y progresión del cáncer de próstata, y el *knockdown* de Nurr1 inhibe la proliferación, migración e invasión de las células tumorales de cáncer de próstata⁶⁶. Además, la disminución en su expresión promueve la apoptosis de células tumorales en cáncer cervicouterino⁶⁸. En cáncer vesical se ha demostrado que inductores químicos que activan este factor de transcripción suprimen el crecimiento de este tipo de cáncer⁶⁹. En melanoma se ha observado que Nurr1 modula la expresión de genes que están relacionados con proliferación celular, supervivencia e invasión⁷⁰. La demostración de la sobre-expresión de Nurr1 en el epitelio normal de mama y disminución de su expresión en carcinoma mamario indica una relación inversa entre el nivel de expresión de Nurr1 y la progresión del cáncer de mama⁷¹.

ANTECEDENTES DIRECTOS

Expresión de los receptores NR4A en los macrófagos humanos generados *in vitro*.

En nuestro laboratorio se realizó un estudio de microarreglos donde describimos la expresión diferencial de genes entre los M ϕ humanos con propiedades inflamatorias y anti-inflamatorias generados *in vitro* con GM-CSF (GM-M ϕ) y M-CSF (M-M ϕ), respectivamente⁶², los cuales tienen propiedades similares a los M ϕ polarizados M1 y M2 mencionados anteriormente. En estos ensayos detectamos la expresión preferencial de *NR4A1* y *NR4A2* en los M-M ϕ , mientras que los transcritos de *NR4A3* se observaron incrementados en los GM-M ϕ (Fig. 1).

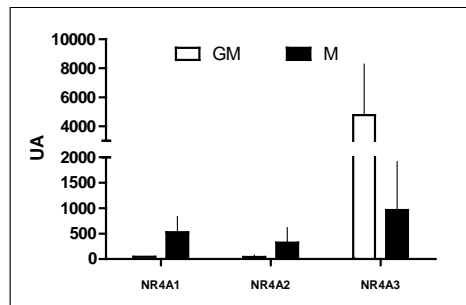


Figura 3. Expresión de los receptores NR4A en los M ϕ humanos polarizados.

Los M ϕ fueron generados mediante el cultivo de monocitos sanguíneos CD14+ con las citocinas GM-CSF (GM) o M-CSF (M) durante 6 días. Pasado este tiempo se extrajo el RNA de las células y se realizaron microarreglos de expresión. Se muestra la expresión del mRNA de *NR4A1*, *NR4A2* y *NR4A3* en los M ϕ aislados de 3 donantes independientes, indicada como la media \pm SD en unidades arbitrarias.

Los tres receptores NR4A se analizaron a nivel de proteína, y se comprobó que Nur77 se expresa preferencialmente en los M-M ϕ , en concordancia con los resultados de los microarreglos de expresión. Sin embargo, NOR-1 no se detectó en ninguna de las poblaciones de M ϕ y, sorprendentemente, Nurr1 se detectó en mayor abundancia en los GM-M ϕ (Fig. 2). La mayor expresión de

Nurr1 en los GM-M ϕ sugiere que su función podría estar relacionada con la actividad pro-inflamatoria de estas células.

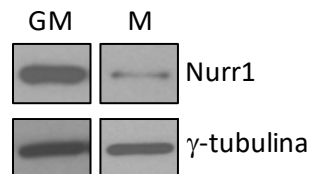


Figura 4. Expresión de Nurr1 en los M ϕ humanos polarizados. Los M ϕ fueron generados mediante el cultivo de monocitos sanguíneos CD14+ con las citocinas GM-CSF (GM) o M-CSF (M) durante 6 días. Pasado este tiempo las células se lisaron y se evaluó la expresión de Nurr1 mediante Western blot. La expresión de γ -tubulina se utilizó como control de carga.

JUSTIFICACIÓN

Los macrófagos M1 expresan niveles elevados de Nurr1. Sin embargo, se desconocen los factores relacionados con la expresión diferencial de Nurr1 *in vitro*, así como su asociación *in vivo* con los macrófagos de fenotipo inflamatorio.

La expresión de Nurr1 ha sido estudiada en enfermedades inflamatorias (ej. artritis reumatoide y psoriasis) donde se ha observado que su sobreexpresión acompaña un incremento de moléculas involucradas en inflamación, proliferación y daño tisular. En enfermedades ampollosas existe aumento de mediadores inflamatorios y abundante infiltrado celular inflamatorio.

Por ello, en este proyecto pretendemos definir algunos de los factores involucrados en la inducción de la expresión de Nurr1 *in vitro*, así como evaluar si en muestras de piel de pacientes con enfermedades ampollosas existe una sobreexpresión de este receptor en los macrófagos de la piel de estos pacientes.

HIPÓTESIS

Los factores pro-inflamatorios incrementan la expresión de Nurr1 en los macrófagos M1 generados *in vitro*. *In vivo*, los macrófagos presentes en la piel de pacientes con enfermedades ampollosas que tengan un perfil inflamatorio sobre-expresan Nurr1.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la expresión de Nurr1 se asocia con el fenotipo pro-inflamatorio de los macrófagos humanos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la expresión proteica de Nurr1 durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos pro-inflamatorios (M1) y anti-inflamatorios (M2).
2. Identificar algunos de los factores que inducen o suprimen la expresión de Nurr1 en los monocitos durante su proceso de diferenciación hacia macrófagos.
3. Determinar si los factores que modifican la expresión de Nurr1 alteran su localización subcelular.
4. Evaluar la expresión de Nurr1 en muestras de piel de pacientes con enfermedades ampollosas.

METODOLOGÍA

1 Aislamiento y purificación de monocitos.

Los concentrados leucocitarios fueron obtenidos a partir de donantes varones sanos de los Bancos de Sangre del CMN “La Raza” del IMSS, el Hospital Ticomán y el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea. Las células fueron sometidas a un gradiente de densidad con Lymphoprep (densidad 1.077 g/mL). Las células fueron centrifugadas a 800 xg durante 30 min a temperatura ambiente y se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la interfase. La población de monocitos CD14+ se purificó a partir de 400 x 10⁶ de PBMC por selección positiva mediante MACS (Magnetic Cell Sorting), utilizando un anticuerpo anti-CD14 conjugado con microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec).

2 Generación de macrófagos de tipo M1 y M2.

Los monocitos CD14+ se cultivaron a una densidad de 0.5 x 10⁶ células/ml para generar M ϕ M1 y 0.7 x 10⁶ células/ml para generar M ϕ M2, en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (HyClone), L-glutamina 2 mM y antibióticos (penicilina y estreptomycin) 1%. El medio fue suplementado con GM-CSF (1000 U/ml, ImmunoTools) o con M-CSF (10 ng/ml, Calbiochem) para inducir la diferenciación de monocitos hacia GM-M ϕ o M-M ϕ , respectivamente. Las citocinas se agregaron cada 48 h (días 0, 2 y 4 de cultivo), y se mantuvieron las células en cultivo durante 6 días.

3 Determinación de la expresión de Nurr1 durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos.

Los monocitos CD14+ en diferenciación se recogieron cada 24 h desde el día 0 hasta el día 6 de cultivo y se lisaron en 60 μ l de solución de lisis [tampón Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, EDTA 5 mM e inhibidores de

proteasas y fosfatasa (Halt™, Thermo Scientific)]. Se determinó la expresión proteica de Nurr1 mediante ensayos de Western blot, como se describe en el apartado 6.

4 Determinación de los factores que inducen o suprimen la expresión de Nurr1 en la diferenciación de monocitos a macrófagos.

La expresión de Nurr1 se evaluó en los monocitos CD14⁺ cultivados durante 2 o 5 días con GM-CSF o M-CSF. En estos tiempos el medio de cultivo se suplementó con los siguientes factores: IFN- β (5 ng/ml, PetroTech), TNF (10 ng/ml, R&D Systems), PGE₂ (100 ng/ml, Calbiochem), e IL-6 (50 ng/ml, Peprotech). Los estímulos se mantuvieron por 3 y 10 h en ambos tipos de M ϕ . Además, las células se cultivaron con estímulos anti-inflamatorios en el día 3 de diferenciación, donde el medio de cultivo se suplementó con los siguientes factores: IL-10 (40 ng/ml, R&D Systems), TGF- β 1 (40 ng/ml, R&D Systems) e IL-4 (120 U/ml, R&D Systems). Los estímulos se agregaron a M ϕ M1 y M2 y se dejaron por 24 h. Una vez pasado el tiempo de los estímulos se recogieron las células, se resuspendieron en 60 μ l de solución de lisis y se determinó la expresión proteica de Nurr1 a través de Western blot, como se describe en el apartado 6.

5 Extracción Núcleo-Citoplasma.

La expresión de Nurr1 a nivel nuclear y citoplásmico se evaluó en M ϕ maduros M1 y M2 del día 6 de diferenciación. El medio de cultivo se suplementó con PGE₂ (100 ng/ml, Calbiochem), los estímulos se mantuvieron de 1-3 hrs. Posteriormente se recogieron las células y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min, se lavaron las células 3 veces retirando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en DPBS y centrifugando a 5000rpm por 5 min. Después del 3er lavado se seca por completo el pellet, posteriormente por cada 5x10⁶ M ϕ se agregara: 2 μ l de inhibidores de proteasas 100x (Thermo

Scientific, cat. 1861281) y después 25µl de solución EB (10ml) [Hepes 10Mm (Thermo Scientific), KCL 40Mm (400µl), CIMg₂ 3Mm (15µl), NP40 0.5% (50µl), Glicerol 5% (500µl), H₂O MQ CBP (8,835µl)], se homogeniza con ayuda de vórtex 4 veces por 20 seg y con posterior incubación a 4°C. A continuación se procede a centrifugar 20 min a 14,000 rpm a 4°C, se retira el sobrenadante que será la fracción citoplásmica y al pellet se agregan 30µl de SDS5% y ésta es la fracción nuclear, ambas se resguardan a -20°C para su posterior análisis a través de Western Blot como se describe en el apartado 6.

6 Ensayos de Western blot.

Los monocitos CD14+, los Mφ en diferenciación, y los Mφ maduros M1 y M2 generados *in vitro* se resuspendieron en solución de lisis y fueron incubados durante 30 min a 4°C y sonicados 5 veces con pulsos de 10 seg a 40 amp. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C para recuperar los lisados de proteínas totales, los cuales fueron almacenados a -80°C hasta su análisis. Los lisados de proteínas totales se analizaron utilizando geles de SDS-PAGE al 10% bajo condiciones reductoras. A continuación, los geles se equilibraron en buffer de transferencia (tampón Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) y transferidos a membranas de PVDF (Immobilon, Millipore). Las membranas fueron bloqueadas con TBS-T (TBS, 0.1% Tween 20) y leche en polvo al 5%, lavadas con TBS-T, e incubadas con el anticuerpo primario anti-Nurr1 (sc-376984, Sta. Cruz Biotech) diluido en TBS-T con leche en polvo al 1% durante 8 h a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-T y fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón mouse conjugado a peroxidasa (HRP) (Dako) y diluido en TBS-T con leche en polvo al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción se reveló mediante el sistema de quimioluminiscencia Immun-Star™ (BioRad Laboratories). Una vez detectada la expresión de Nurr1, las membranas se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-γ-tubulina (Sigma-Aldrich). La densidad de las bandas fue analizada con el programa Image/J versión 1.42q.

6 Inmunofluorescencia de macrófagos *in vitro*.

Los M ϕ fueron cultivados en placas de 24 pozos colocando previamente en el fondo de cada pozo un cubreobjetos estéril de 13 mm. En el día 6 de diferenciación tanto los M ϕ M1 como M2 fueron sometidos a un estímulo con PGE₂ (100 ng/ml) durante 1, 2, 3, o 10 h. Los M ϕ control se cultivarán durante esos mismos tiempos en ausencia de los estímulos. Una vez concluidos los tiempos de estimulación el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron con PBS 0.1 M. Posteriormente las células se fijaron con formaldehído al 3.7 % (Sigma-Aldrich) durante 15 min y fueron lavadas con PBS 0.1 M. Posteriormente se adicionó la solución de permeabilización (Tritón X-100 0.3 %, diluido en PBS 0.1 M) durante 15 min. A continuación se adicionó buffer de bloqueo (Tritón X-100 0.3 %, Inmunoglobulinas humanas [50mg/ml], 1:500 en PBS 0.1 M). Pasado este tiempo las células se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron con el anticuerpo anti-Nurr1 (sc-376984) en buffer de bloqueo (Tritón X-100 0.3 %, PBS, IgG humanas 1:500) durante 8 h a 4°C. Pasado este tiempo las células se lavaron con PBS y después se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor® 488 diluido 1:500 en buffer de bloqueo durante 1 h. En los últimos 10 min de incubación se adiciono DAPI para la tinción de los núcleos. Por último las células se lavaron con PBS y se colocaron sobre un portaobjetos utilizando Vectashield como solución de montaje, para su posterior análisis en un microscopio Confocal Leica SP8. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de Nurr1 en el núcleo y el citoplasma celular por ROIs (regiones de interés) en el programa FIJI (Image/J).

5 Inmunofluorescencia de cortes de biopsias de pacientes con pénfigoide ampoloso.

Las muestras de piel de pacientes con pénfigo ampoloso, así como muestras de piel de individuos sanos, fueron donadas por la Dra. Paloma Sánchez-

Mateos (Hospital General Universitario “Gregorio Marañón, Madrid, España)⁷³. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se cortaron en un criostato en secciones de 8-10 μm .

Se realizó bloqueo con inmunoglobulinas humanas (50 mg/ml) a una dilución 1:1000 en PBS.

Por cada muestra se analizaron tres anticuerpos conjuntamente: un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Nurr1, utilizando como anticuerpo secundario un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor® 488 (Thermo Scientific), un anticuerpo policlonal de cabra anti-CD163 (marcador pan-macrofágico, Dako), utilizando como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado a Cy5®, conjuntamente con alguno de los siguientes anticuerpos:

- 1) anticuerpo policlonal de conejo anti-TNF (Abcam),
- 2) anticuerpo policlonal de conejo anti-CD163L1 (Sigma-Aldrich),

Para estos dos últimos se utilizó como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor® 647 (Thermo Scientific).

Una vez realizado el bloqueo, se realizó la incubación de los anticuerpos primarios por 90 min a una dilución 1:100 en PBS. Después se agregaron los anticuerpos secundarios usando una dilución 1:100 en PBS y protegiendo de la luz y se incubaron durante 90 min. Para teñir los núcleos se utilizó DAPI a dilución 1:5000 en PBS colocándolo en los últimos 10 min de incubación de los anticuerpos secundarios, para después lavar las muestras con PBS. Por último se colocó el cubreobjetos utilizando medio de montaje (Dako).

Una vez realizadas las tinciones, la expresión del receptor Nurr1 en los $M\phi$ *in vivo* se evaluó mediante microscopía Confocal. Las muestras se analizaron en un microscopio Confocal Leica SP3, utilizando el software LCS Lite (Leica). Se cuantifico la intensidad de fluorescencia por ROIs en el programa FIJI (Image/J).

| Características | Donantes sanos | | | Pacientes con Pénfigo | | |
|------------------------------|-----------------------|---------|---------|------------------------------|--------------|---------------|
| Número de muestras | D1 | D2 | D3 | P1 | P2 | P3 |
| Edad | 38 años | 60 años | 69 años | 69 años | 85 años | 91 años |
| Sexo | Masc. | Masc. | Fem. | Masc. | Fem. | Masc. |
| Tratamiento | Sin Tx | Sin Tx | Sin Tx | Sin Tx | Sin Tx | Sin Tx |
| Tiempo de Diagnostico | Sin Dx | Sin Dx | Sin Dx | Inicio de Dx | Inicio de Dx | Inicio de Dx. |

6 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando los programas Excel y GraphPad Prism 6. Se utilizó el test paramétrico T de Student para comparar los grupos de los datos generados *in vitro*, y se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para comparar las variables categóricas con variables continuas. Los grupos de valores se expresaron como la media \pm SEM. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se aplicó a la expresión de cada uno de los marcadores, de cada una de las muestras, ya que se compararon los distintos marcadores de M ϕ a partir de la misma imagen.

RESULTADOS

Nurr1 se expresa preferentemente en los macrófagos M1 durante el proceso de diferenciación.

La expresión proteica del receptor nuclear Nurr1 fue valorada en las poblaciones de M ϕ M1 y M2 generados *in vitro* a partir de monocitos CD14+ de donantes sanos. Se analizaron lisados celulares de cada uno de los días del proceso de diferenciación (día 0-6), para valorar la expresión de Nurr1.

Se observó que las células precursoras (monocitos CD14+) no mostraron cantidades detectables de Nurr1, al igual que los M ϕ M1 y M2 del primer día de diferenciación (Fig. 5). El segundo día de diferenciación muestra el inicio de la expresión del receptor a bajo nivel en ambos tipos de M ϕ . Un día después se identificó un incremento de la expresión proteica en ambos fenotipos de M ϕ . Sin embargo, en el cuarto día de diferenciación se detectó una expresión preferencial de Nurr1 en los M ϕ M1 (Fig. 5), y además un ligero incremento de su expresión en comparación con el día anterior, mientras que los M ϕ M2 ya no mostraron cantidades detectables de la proteína. Este comportamiento continuó observándose hasta el último día de diferenciación (día 6) (Fig. 5).

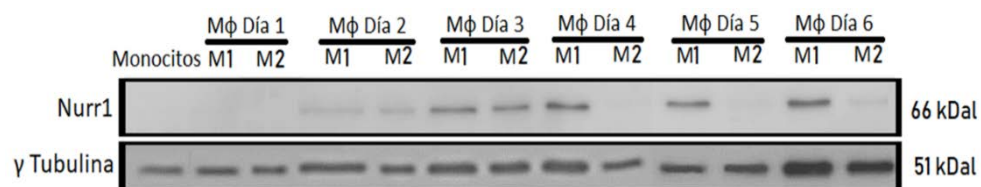


Figura 5. Expresión de Nurr1 en los M ϕ M1 y M2 durante el proceso de diferenciación. Western blot representativo de la expresión proteica de Nurr1 en monocitos CD14+ y durante la diferenciación de M ϕ M1 y M2 generados en presencia de GM-CSF y de M-CSF, respectivamente. La expresión se valoró cada 24 h de cultivo. La expresión de γ -tubulina se empleó como control de carga. M ϕ : Macrófagos.

Los resultados obtenidos indican que Nurr1 se induce en los M ϕ M1 y M2 durante el proceso de diferenciación con GM-CSF o M-CSF. En el caso de los M ϕ M2 esta inducción es transitoria, mientras que en M ϕ M1 esta inducción es más estable.

Estímulos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios promueven cambios diferenciales en la expresión de Nurr1 en los macrófagos M1 y M2.

Con el propósito de identificar factores que modifiquen la expresión de Nurr1, valoramos el comportamiento de la expresión de este receptor nuclear en M ϕ M1 y M2 tras el uso de factores asociados al fenotipo M1 (TNF, IFN- β , PGE₂ e IL-6) y M2 (IL-10, TGF- β 1 e IL-4). La expresión de Nurr1 fue valorada a través de Western blot.

El estímulo con mayor capacidad inductora de la expresión del receptor Nurr1 fue IL-4 en el caso de los M ϕ M1. Además, otros estímulos como IFN- β , TNF y TGF- β 1 también indujeron la expresión de Nurr1 en estos M ϕ en menor medida (Fig. 6A, 6B). Por otro lado, observamos que IL-6 es el estímulo con mayor capacidad represora de la expresión de Nurr1 de los que evaluamos, mientras que IL-10 y PGE₂ no mostraron efectos importantes sobre la expresión de la proteína (Fig. 6A, 6B).

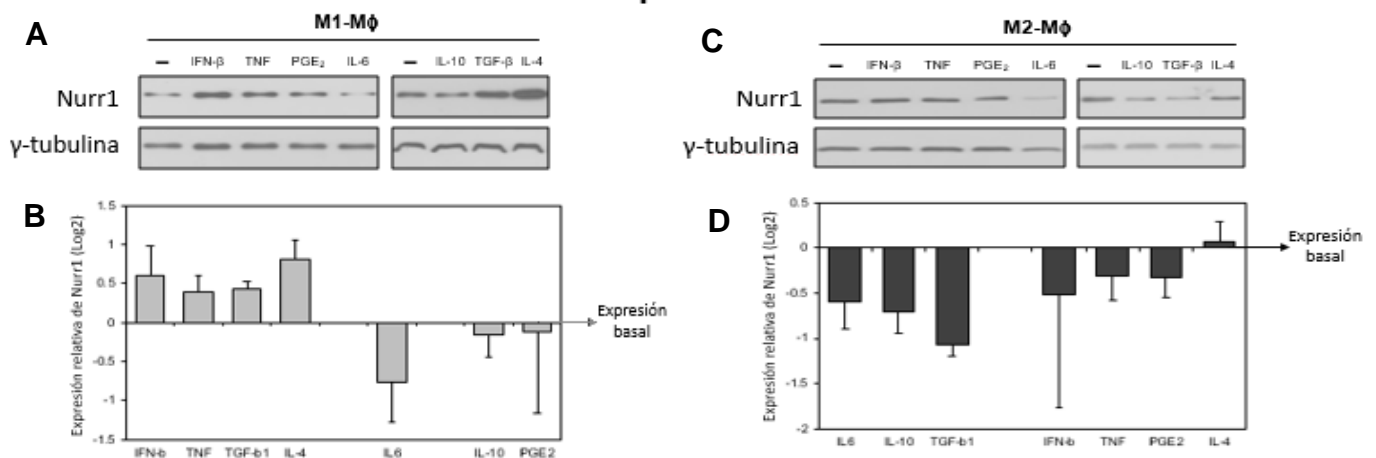


Figura 6. Inductores y represores de la expresión de Nurr1 en los macrófagos M1 y M2.

Los M ϕ M1 y M2 se diferenciaron con GM-CSF y M-CSF respectivamente. **A, C**) Western Blots representativos de la expresión proteica de Nurr1 tras la incubación de los M ϕ M1 y M2 con los estímulos indicados (n=2-4 experimentos independientes). **B, D**) Gráficas que representan la expresión relativa de Nurr1 (Log₂) normalizada con respecto a su control de carga γ -tubulina. Las barras muestran la media \pm SEM de la expresión relativa de Nurr1 representado en unidades arbitrarias (a.u.). El valor 0 se asignó a la expresión de Nurr1 en los M ϕ de forma basal (en ausencia de estímulo). Estímulos: IFN- β (5 ng/ml), TNF (10 ng/ml), PGE₂ (100 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml), IL-10 (40 ng/ml), TGF- β 1 (40 ng/ml), IL-4 (120 U/ml).

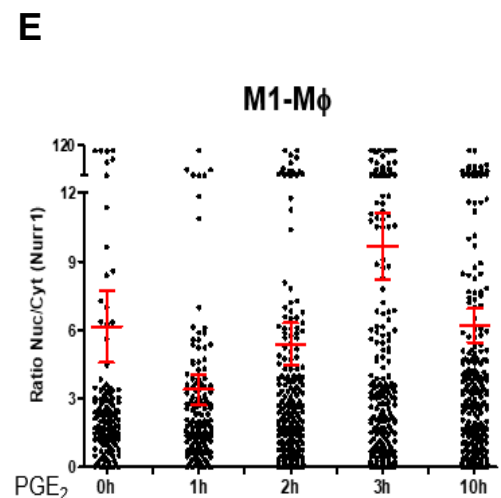
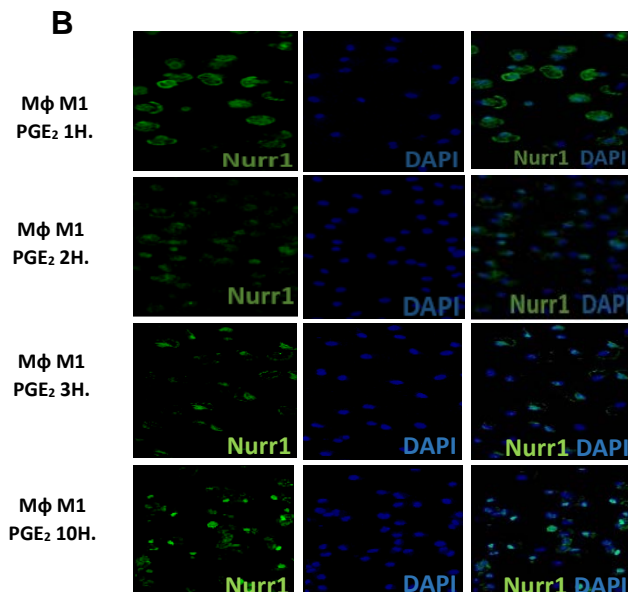
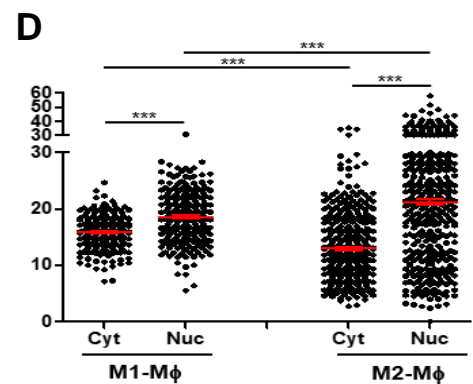
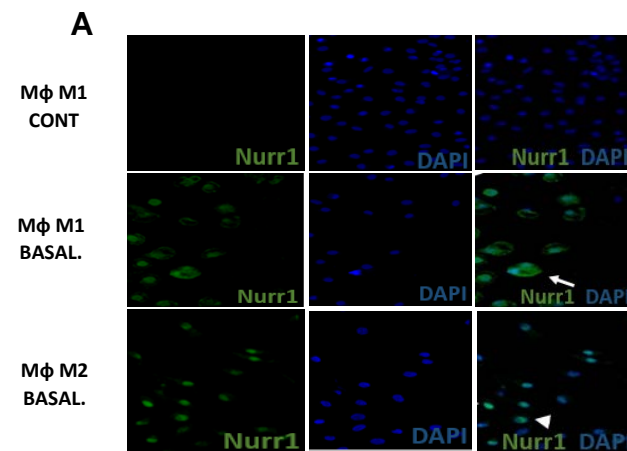
Al analizar la expresión de Nurr1 con los diferentes estímulos en los M ϕ M2 observamos que en general la mayoría de los estímulos tendieron a suprimir la expresión de la proteína. El estímulo que genera mayor represión de la expresión de Nurr1 fue TGF- β 1, mientras que IL-10 e IL-6 también generaron una supresión en la expresión del receptor nuclear, pero en menor medida (Fig. 6C, 6D). El resto de los estímulos (IFN- β , TNF, PGE₂ e IL-4) no mostraron cambios importantes en la expresión proteica de Nurr1 (Fig. 6C, 6D). Lo anterior denota que en los M ϕ M1 algunos factores M1 y M2 tienen efectos heterogéneos y no se observa un efecto similar entre factores del mismo tipo (M1 o M2) sobre la expresión de Nurr1, mientras que en los M ϕ M2 aún no hemos identificado un estímulo que induzca la expresión del receptor nuclear, pues la mayoría tienden a reprimir la expresión.

Relocalización subcelular de Nurr1 tras el estímulo con PGE₂.

Con la finalidad de evaluar la localización subcelular de Nurr1 en presencia de estímulos inflamatorios, se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta los M ϕ M1 y M2 generados *in vitro* de forma basal y tras ser incubados con PGE₂ (Fig. 7 A-C). Se analizó de forma cuantitativa la intensidad relativa de fluorescencia de Nurr1 en las imágenes de microscopia Confocal en el núcleo y en el citoplasma de los M ϕ .

De forma basal la proteína está presente en ambos compartimentos subcelulares en los M ϕ M1 y M2. En los M ϕ M1 se detectó una ligera predominancia a nivel nuclear, mientras que en los M ϕ M2 la predominancia a nivel nuclear fue mayor en comparación con los M ϕ M1 (Fig. 7D). La predominancia de Nurr1 observada a nivel nuclear de forma basal disminuyó tras el estímulo con PGE₂ por 1 h en los M ϕ M1, evidenciado por la disminución en la relación núcleo-citoplasma del receptor (Fig. 7B, 7E). Tras 2 y 10 h de estímulo esta relación fue similar a la observada en ausencia de estímulo, y es el estímulo de 3 h el que generó la mayor expresión nuclear de Nurr1 en comparación con el resto de los tiempos evaluados (Fig. 7E). En los M ϕ M2 se observó que los estímulos con PGE₂ de 1, 2 y 3 h

disminuyó la relación núcleo-citoplasma con respecto a la condición basal, mientras que el estímulo de 10 h fue el que produjo la mayor expresión nuclear de Nurr1, reflejado por el aumento de la relación núcleo-citoplasma de casi el doble en comparación con el nivel basal (Fig. 7C, 7F).



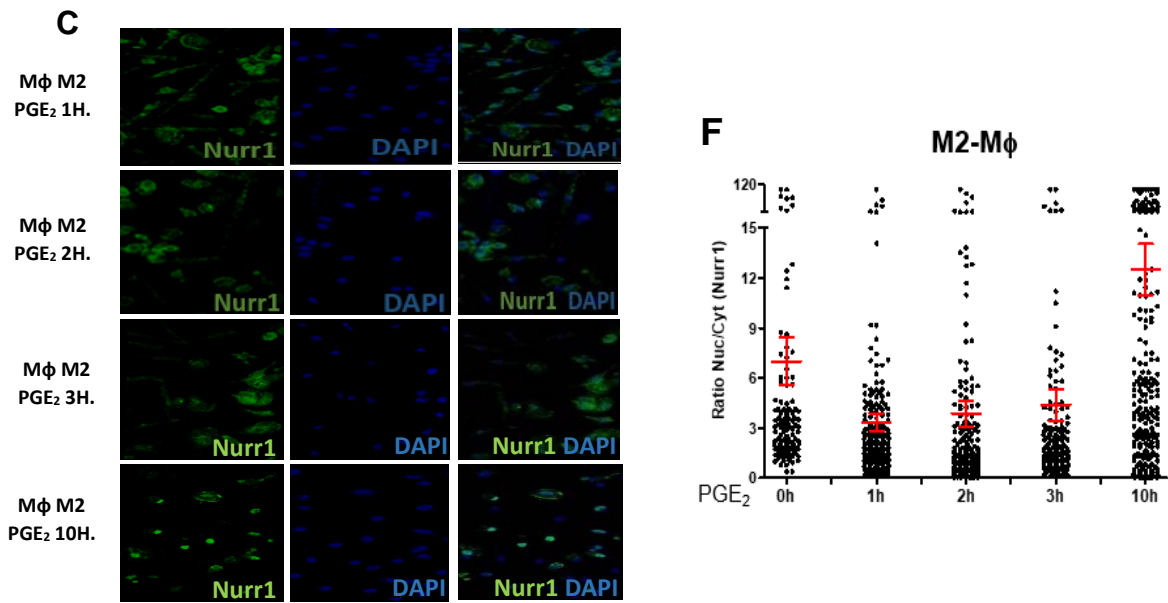


Figura 7. Localización subcelular de Nurr1 en los macrófagos M1 y M2 tras estímulo con PGE₂. **A, B, C)** Imágenes representativas de microscopía Confocal, donde se valora la expresión de Nurr1 a nivel nuclear y citoplásmico de forma basal y tras el estímulo con PGE₂ (100 ng/ml) en los Mφ M1 y M2 generados *in vitro*. Las flechas denotan la expresión de Nurr1 en el núcleo y el citoplasma celulares. La punta de flecha denota la expresión de Nurr1 predominantemente nuclear. **D)** Expresión basal de Nurr1 a nivel de núcleo y citoplasma en los Mφ M1 y M2. **E, F)** Relación de la expresión de Nurr1 entre el núcleo y el citoplasma de los Mφ M1 (E) y M2 (F) en condiciones basales (0 h) y tras 1, 2, 3 o 10 h de estimulación con PGE₂. Cada punto representa el valor de intensidad relativa de fluorescencia de una célula. Barras rojas: valor de la media ± SEM de la intensidad relativa de fluorescencia. *** p:<0.0005.

Con el fin de realizar un análisis más completo de la expresión de Nurr1 en los compartimentos celulares, realizamos extracción núcleo-citoplasma y a través de Western blot analizamos la expresión de proteína.

Se analizaron los Mφ M1 y M2 de forma basal y tras el estímulo con PGE₂ por 1, 2 y 3 h. La expresión de Nurr1 en los Mφ M1 aumentó a nivel nuclear tras 1 y 2 h de incubación con PGE₂, mientras que a nivel citoplásmico se observó una disminución de su expresión con respecto al nivel basal. Después de 3 h PGE₂ produjo una fuerte disminución de Nurr1 en el núcleo, mientras que mantuvo sus niveles en el citoplasma (Fig. 8A, 8C). En los Mφ M2 se evidenció una disminución en la expresión de Nurr1 a nivel nuclear de forma paulatina tras el estímulo con PGE₂ (1-3 h), y paralelamente la proteína mostró un aumento progresivo de su expresión a nivel citoplásmico (Fig. 8B, 8D).

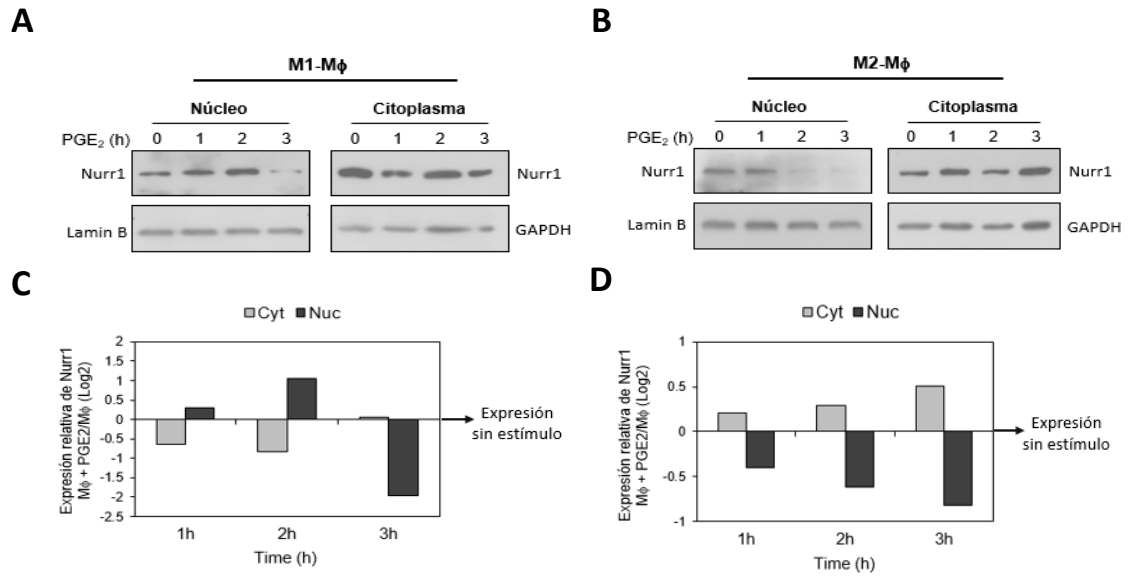


Figura 8. Expresión proteica de Nurr1 en el núcleo y el citoplasma de los M ϕ M1 y M2 tras estímulo con PGE₂. **A, B)** Western blot de Nurr1 a nivel citoplásmico y nuclear en los M ϕ M1 y M2 de forma basal (0) y tras el estímulo con 100 ng/ml de PGE₂ después de 1, 2 o 3 h. El control de carga para las fracciones nucleares fue lamin B, y GAPDH para las fracciones citoplásmicas **C, D)** Graficas que muestran la expresión normalizada de Nurr1 (Log₂) con respecto a su control de carga (lamin B o GAPDH). El valor de 0 corresponde a la expresión de Nurr1 en los M ϕ en ausencia de estímulo. Se muestran los datos de un donante.

Expresión de Nurr1 en muestras de piel de pacientes con pénfigo ampoloso.

Una vez valorada la expresión de Nurr1 en los M ϕ *in vitro* decidimos determinar la expresión de este receptor *in vivo* en una enfermedad inflamatoria, por lo que realizamos un análisis de muestras de piel de pacientes con pénfigo ampoloso, valorando su expresión en subpoblaciones de M ϕ (pro- y anti-inflamatorios).

Evaluamos la expresión de Nurr1 en biopsias de 3 pacientes con pénfigo ampoloso y la comparamos con su expresión en 3 muestras de piel de donantes sanos. Realizamos inmunofluorescencia del tejido y utilizando microscopía Confocal hicimos el análisis de la expresión de Nurr1 conjuntamente con los siguientes marcadores: CD163 (marcador pan-macrofagico en la piel), TNF (marcador de M ϕ M1), y CD163L1 (marcador de M ϕ M2).

En primera instancia, observando las imágenes de microscopia Confocal, identificamos dos características importantes. La primera fue que la cantidad de M ϕ infiltrados en la piel de pacientes con pénfigo ampoloso era mayor que los encontrados en la piel de donantes sanos (Fig. 9A, 9B). La segunda característica fue la heterogeneidad en la expresión de Nurr1 en los M ϕ presentes en la dermis, tanto de donantes sanos como de pacientes con pénfigo (Fig. 9A, 9B).

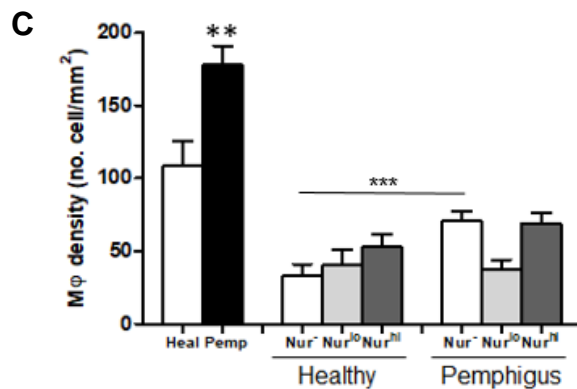
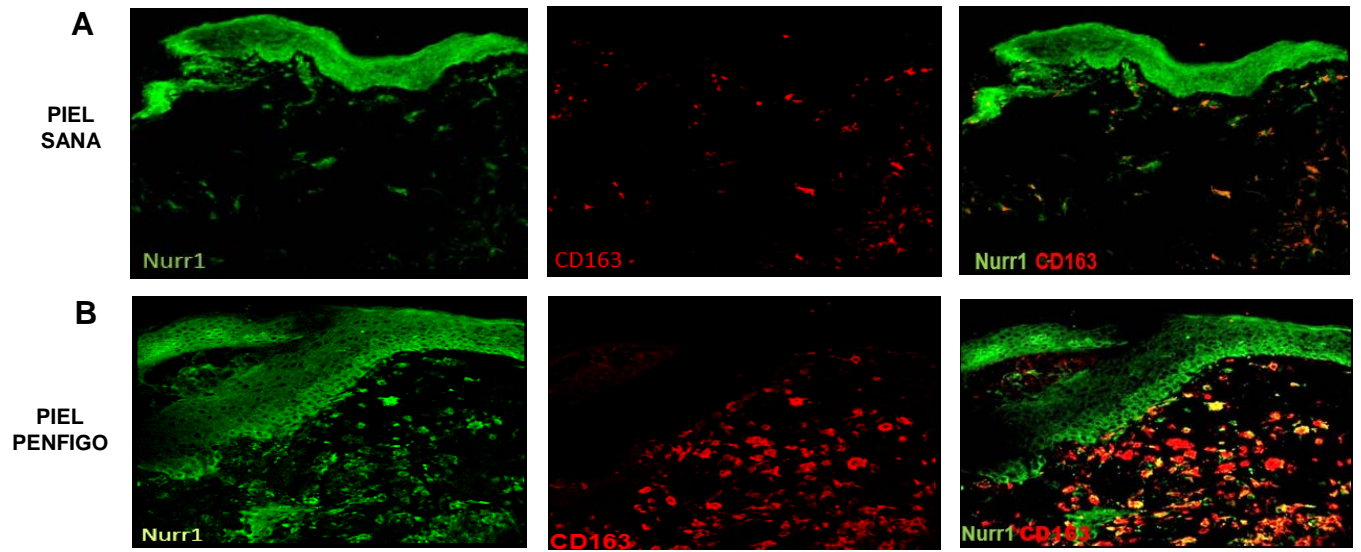


Figura 9. Expresión de Nurr1 en Mφ dérmicos de donantes sanos y de pacientes con pénfigo ampuloso. A, B) Imágenes representativas de la expresión de Nurr1 (verde, panel izquierdo) y CD163 (rojo, panel central) en muestras de piel de donantes sanos (A) y de pacientes con pénfigo ampuloso (B). La expresión de ambos marcadores se muestra en los paneles derechos. **C)** Densidad de los Mφ presentes en la dermis, valorada mediante la expresión de CD163, expresada como el número de células/mm². Se indica la media \pm SEM de los valores obtenidos en 3 donantes sanos (barra blanca, Heal) y en 3 donantes con pénfigo (barra negra, Pemp). Las siguientes barras muestran la densidad de los Mφ en función de su expresión de Nurr1 en donantes sanos (healthy) o en pacientes con pénfigo (pemphigus): Mφ que no expresan Nurr1 (intensidad relativa de fluorescencia < 30 unidades arbitrarias, Nur⁻), Mφ que expresan bajos niveles de Nurr1 (intensidad relativa de fluorescencia 30-49.9 unidades arbitrarias, Nurⁱ⁰) y Mφ que expresan altos niveles de Nurr1 (intensidad relativa de fluorescencia \geq 50 unidades arbitrarias, Nur^{hi}). Estadística: **p<0.005, ***p<0.0005.

Una vez que realizamos el análisis cuantitativo del número de células presentes por milímetro cuadrado, determinamos la densidad de los M ϕ presentes en la dermis y comprobamos que era mayor el número de M ϕ infiltrados en pacientes con pénfigo que en donantes sanos (Fig. 9C). Por otro lado, la expresión del receptor Nurr1 en los M ϕ dérmicos fue muy heterogénea, por lo que decidimos clasificar a los M ϕ dependiendo de la expresión de Nurr1 como: M ϕ Nurr1 negativos (Nurr1⁻), con una expresión intermedia de Nurr1 (Nurr1^{lo}), y con una expresión elevada de Nurr1 (Nurr1^{hi}). Una vez realizada esta clasificación pudimos identificar que el mayor infiltrado de M ϕ presentes en la piel de los pacientes con pénfigo ampollosa es resultado de una mayor presencia de M ϕ Nurr1⁻ y Nurr1^{hi}, en comparación con la piel de donantes sanos, mientras que la subpoblación de M ϕ Nurr1^{lo} se mantiene en cantidades similares en los pacientes y en los controles (Fig. 9C).

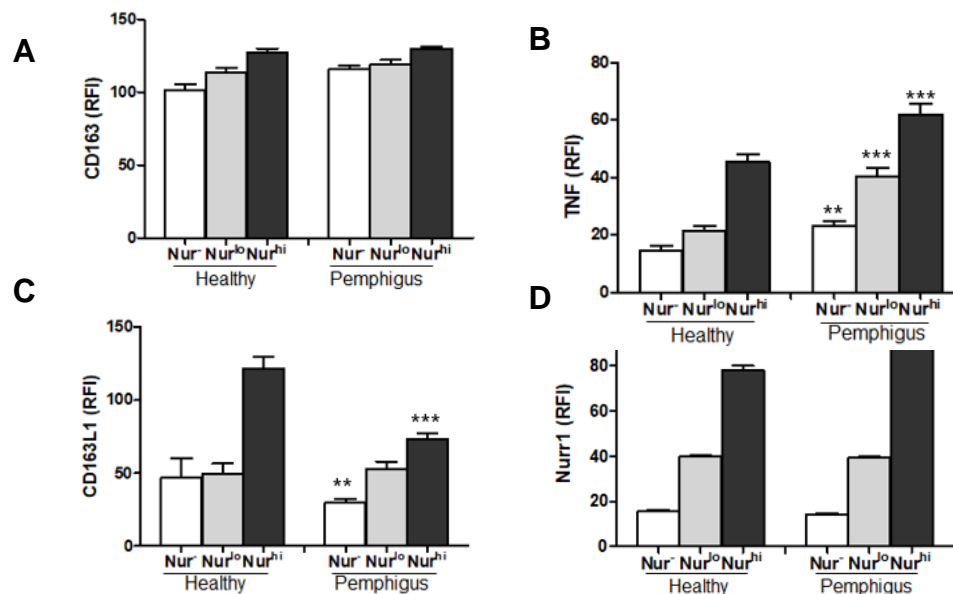


Figura 10. Fenotipo de los macrófagos dérmicos en función de la expresión de Nurr1. El fenotipo de los M ϕ dérmicos se evaluó en 3 donantes sanos (Healthy) y en 3 pacientes con pénfigo ampollosa (Pemphigus). Los M ϕ se subclasificaron en tres categorías de acuerdo a su expresión de Nurr1, como se indica en la Fig. 9. Expresión de CD163 **A**), TNF **B**), CD163L1 **C**) y Nurr1 **D**), expresada como intensidad relativa de fluorescencia (RFI) en los M ϕ Nur⁻, Nur^{lo} y Nur^{hi}. Los valores se representan como la media \pm SEM de la RFI de cada uno de los marcadores. Estadística: individuos sanos vs pacientes con pénfigo, **p<0.005, ***p<0.0005.

Analizando la intensidad relativa de fluorescencia de cada uno de los marcadores en los M ϕ clasificados según la expresión de Nurr1, observamos en primera instancia que la expresión del marcador pan-macrofágico CD163 se expresa de forma similar en cada uno de los subgrupos de M ϕ de piel de pacientes con pénfigo ampolloso y de donantes sanos, lo que denota que la enfermedad no genera ningún sesgo en el análisis de la población general de M ϕ (Fig. 10A). El marcador de M ϕ M1 TNF mostró una expresión preferencial en los M ϕ Nur^{hi} tanto en los pacientes como en los sujetos sanos (Fig. 10B). Además, y en concordancia con el carácter inflamatorio de la enfermedad, se detectó una expresión incrementada de TNF en todos los subtipos de M ϕ de los pacientes con pénfigo con respecto a los donantes sanos (Fig. 10B). La expresión de CD163L1, marcador de M ϕ M2, también se detectó incrementada en los M ϕ Nur^{hi}, independientemente de su origen (pacientes o sujetos sanos) (Fig. 10C). Sin embargo, de manera contraria a la expresión de TNF, la expresión de CD163L1 estaba incrementada en los M ϕ de los donantes sanos, significativamente en los M ϕ Nur y Nur^{hi} (Fig. 10C). Finalmente, la expresión de Nurr1 se detectó significativamente incrementada en los M ϕ Nur^{hi} de los pacientes con respecto a los sujetos sanos, mientras que los M ϕ Nur^{lo} expresaron niveles similares de Nurr1 (Fig. 10D).

DISCUSIÓN

Los M ϕ son células pertenecientes al sistema inmune innato que constituyen una primera línea de defensa contra microorganismos patógenos y células tumorales. Son células que inician, perpetúan, o resuelven procesos inflamatorios, modulando la respuesta de células del sistema inmune adaptativo (linfocitos T y B). Además, participan en la regeneración y remodelación tisular^{1,2}. Las funciones de los M ϕ dependen de los diferentes estímulos (citocinas, quimiocinas, leucotrienos) que están presentes en el microambiente tisular, debido a que estos estímulos tienen un papel definitorio en el estado de activación y/o polarización (pro/anti-inflamatoria) de estas células^{2,3,8,78}. Los M ϕ se ha clasificado según su tipo de activación: la activación clásica (pro-inflamatoria) que es resultado del estímulo con citocinas de tipo Th1 (TNF, IFN- γ) o estructuras derivadas de patógenos (LPS), mientras que la activación alternativa (anti-inflamatoria) es generada por estímulos con citocinas Th2 (IL-4, IL-10, IL-13). El primer tipo de M ϕ se caracteriza por generar respuestas inflamatorias de tipo 1, eliminar patógenos intracelulares y células tumorales; mientras que los segundos se distinguen por favorecer la respuesta inflamatoria de tipo 2 relacionada con alergias, eliminación de parásitos, inmunoregulación y remodelación tisular^{2,3}.

El desequilibrio en los estímulos que generan una activación clásica y alternativa de los M ϕ puede generar pérdida de la homeostasis tisular⁴. Se ha demostrado que estímulos pro-inflamatorios persistentes en el microambiente tisular generan fallas en el cambio del fenotipo de M ϕ pro-inflamatorios a anti-inflamatorios, impidiendo la resolución de procesos inflamatorios y formando parte de la patogénesis de múltiples enfermedades^{4,10}.

Actualmente se mantiene un interés por dilucidar marcadores de M ϕ M1 y M2 que permitan identificar con mayor precisión subpoblaciones de estos *in vivo*. Se han descrito sólo algunas moléculas como marcadores de M ϕ M1, como la lectina CLEC5A o la citocina TNF, y de M ϕ M2, como el receptor *scavenger*

CD163L1, el receptor de folato (FR) β , la lectina CD209, o la citocina IL-10^{73,75,76}. El hecho de poder identificar mejor los fenotipos de M ϕ M1 y M2 cobra importancia debido a que nos permitiría conocer mejor el comportamiento y funcionalidad de estas células, y por consiguiente podríamos utilizar estos marcadores para evaluar y/o dar seguimiento de algunas patologías (autoinmunes, infecciosas, oncológicas, etc.), permitiendo un mejor diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades. En este trabajo identificamos la expresión proteica del receptor nuclear Nurr1, tanto *in vitro* como *in vivo*, asociada a M ϕ de fenotipo pro-inflamatorio M1.

La identificación y el análisis del receptor nuclear Nurr1 surgieron a partir de ensayos de microarreglos de expresión, donde valoramos la expresión diferencial de genes en M ϕ humanos generados *in vitro* con GM-CSF (pro-inflamatorios) y M-CSF (anti-inflamatorios). Además de ello, en nuestro laboratorio habíamos identificado una expresión preferencial del receptor nuclear en los M ϕ M1. Adicionalmente, tomamos en cuenta trabajos donde se demuestra la implicación de Nurr1 en procesos y enfermedades inflamatorias^{40,53,56,57}.

En primera instancia decidimos analizar la expresión proteica de Nurr1 durante el proceso de diferenciación de monocitos a M ϕ M1 y M2, utilizando esquemas de diferenciación de M ϕ ya descritos y publicados^{73,76,77}. Comprobamos que la expresión de Nurr1 fue detectable sólo a partir del día 2 de diferenciación en los M ϕ M1 y M2. A partir del día 4 observamos una expresión preferencial de Nurr1 en los M ϕ M1, y este comportamiento se mantuvo hasta el término de la diferenciación, lo que sugiere que el receptor se induce de manera estable en los cultivos con GM-CSF, pero sólo de forma transitoria con M-CSF. Este comportamiento en la expresión de Nurr1 durante la polarización de los M ϕ no se descrito en la literatura, pero este fenómeno concuerda con el observado para otros marcadores de M ϕ M1 y M2, donde se ha demostrado que a partir

del día 3-4 de diferenciación las células expresan de forma diferencial moléculas que caracterizan a cada una de las poblaciones macrófagicas^{73,76}.

Una vez que conocimos la expresión de Nurr1 durante el proceso de diferenciación decidimos valorar el comportamiento del receptor en presencia de factores asociados al fenotipo M1 (IFN- β , TNF, PGE₂ e IL-6) y o al fenotipo M2 (IL-10, TGF- β 1 e IL-4). En la literatura se ha descrito que IL-1 β , TNF, IL-6 y PGE₂ son inductores de la expresión de Nurr1 en líneas celulares de sinoviocitos^{50,53}. Sin embargo, nuestros datos reflejan un comportamiento muy heterogéneo de estos inductores, donde TNF induce la expresión de Nurr1 en M ϕ M1 pero no en los M ϕ M2, mientras que PGE₂ no muestran cambios importantes de la proteína en ninguno de los dos tipos celulares. IL-6 suprimió la expresión de Nurr1 tanto en los M ϕ M1 como en los M2. Por lo tanto, los estímulos inductores de la expresión de Nurr1 ya conocidos en la literatura no generan el mismo efecto en nuestras células de estudio. Como datos a resaltar, nosotros demostramos en este trabajo que IL-4, IFN- β y TGF- β 1 inducen la expresión de este receptor nuclear en los M ϕ M1 pero, de manera interesante, IL-4 generó la mayor inducción de la proteína en estas células, mientras que TGF- β 1 generó un efecto contrario en los M ϕ M2. Ambos estímulos están relacionados con la vía inflamatoria de tipo 2 y, sin embargo, en la literatura sólo se ha valorado la expresión de Nurr1 con citocinas y factores relacionados a procesos inflamatorios de tipo 1, así como en enfermedades que presentan este tipo de inflamación^{53,56,57}. Por ello, sería fundamental valorar la presencia de Nurr1 en procesos inflamatorios de tipo 2, así como en enfermedades relacionadas con este tipo de inflamación.

Se ha descrito que el receptor Nurr1 está involucrado en diversos procesos biológicos de diferentes tipos celulares, pero también se ha observado que las múltiples funciones que lleva a cabo Nurr1 dependen de su localización subcelular^{39,53,79,80,81}. En otros trabajos se ha descrito que su presencia en

citoplasma puede ser un marcador de mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer^{79,81,82}. Es por ello que valoramos la localización de Nurr1 de forma basal y posterior a estímulos con PGE₂. A través de microscopía Confocal pudimos identificar que de manera basal Nurr1 está presente tanto en núcleo como en el citoplasma de los Mφ M1 y M2, y aunque en ambas células predomina a nivel nuclear, esta preferencia es más notoria en los Mφ M2. En la literatura ya se había descrito que Nurr1 muestra una localización nuclear predominante en líneas celulares de neuronas dopaminérgicas humanas y de ratón⁸⁰. Tras el estímulo con PGE₂ a diferentes tiempos pudimos observar que existe una acumulación de Nurr1 a nivel nuclear en los Mφ M1, mientras que en citoplasma detectamos una disminución de la proteína; y este fenómeno se presentó de forma inversa en los Mφ M2. Mediante ensayos de Western blot observamos que tras 1-2 h de estimulación con PGE₂ se genera una acumulación a nivel nuclear de Nurr1 y una disminución a nivel del citoplasma en los Mφ M1. Sin embargo, después de 3 h la expresión nuclear de Nurr1 disminuye y se mantiene su expresión en citoplasma. Este fenómeno podría ser reflejo de una degradación de la proteína, pues se ha descrito que la función y presencia de Nurr1 a nivel nuclear puede ser regulada a través de la degradación vía proteosoma dentro del mismo núcleo, siendo éste el sitio principal de degradación del receptor nuclear⁸³. En los Mφ M2 observamos que posterior al estímulo de 1, 2 y 3 horas de PGE₂ la presencia de Nurr1 a nivel nuclear disminuye paulatinamente e incrementa de la misma forma en citoplasma, lo que sugiere que a pesar de que basalmente la localización de Nurr1 en ambos tipos de Mφ es de cierta forma similar, cuando estas células reciben estímulos con PGE₂ se produce una relocalización de la proteína de forma inversa en los Mφ M1 en comparación con los Mφ M2.

Como parte final de este proyecto, una vez realizados los análisis *in vitro* decidimos valorar la expresión de Nurr1 *in vivo*, por lo que se analizaron muestras de piel de pacientes con pénfigo ampolloso. Hay que destacar que Nurr1 ha sido vinculado a procesos inflamatorios presentes en varias

enfermedades de carácter autoinmune, principalmente artritis reumatoide y psoriasis^{53,54,56}.

Analizamos las muestras de piel de los pacientes y de donantes sanos utilizando el marcador pan-macrofágico CD163 y los marcadores de M ϕ M1 y M2 TNF y CD163L1, respectivamente. Clasificamos las poblaciones de M ϕ con base en la expresión de Nurr1 en M ϕ Nur⁻, Nur^{lo} y Nur^{hi}, esto debido a la expresión heterogénea de Nurr1 que detectamos tanto en los pacientes como en los controles. Comparando la expresión diferencial de los marcadores, identificamos una mayor densidad de M ϕ en los pacientes con pénfigo en comparación con los donantes sanos, dato que concuerda con lo ya descrito anteriormente en la literatura^{23,24}. Además observamos que este mayor infiltrado es resultado de una mayor presencia de M ϕ Nur⁻ y Nur^{hi}.

Por otro lado, demostramos que las subpoblaciones Nur⁻ y Nur^{hi} en pacientes con pénfigo expresan bajos niveles de CD163L1 y altos niveles de TNF en comparación con sus equivalentes en donantes sanos, denotando un perfil más cercano al fenotipo M1. Además, el análisis de la propia expresión de Nurr1 corroboró que la subpoblación de M ϕ Nur^{hi} de pacientes con pénfigo expresa mayores niveles del receptor nuclear en comparación con los de donantes sanos. En conjunto estos datos sugieren que hay una relación estrecha entre el fenotipo de los M ϕ M1 y la expresión de Nurr1, de forma que la expresión de esta proteína podría caracterizar el fenotipo M1 *in vivo*.

CONCLUSIONES

1. La expresión de Nurr1 durante el proceso de diferenciación muestra una inducción sostenida en los macrófagos M1 y transitoria en el caso de los macrófagos M2, lo que sugiere que el GM-CSF o factores inducidos por esta citocina son responsables de la expresión elevada de forma basal de Nurr1 en los macrófagos inflamatorios.
2. Nurr1 presenta una regulación compleja en los macrófagos M1, ya que tanto estímulos inflamatorios de tipo 1 y 2 (TNF, IFN- β , IL-4) como la citocina anti-inflamatoria TGF- β 1 incrementan su expresión. Hasta el momento no hemos identificado ningún factor que induzca la expresión de Nurr1 en los macrófagos M2.
3. Nurr1 se expresa de forma similar en el núcleo y el citoplasma de los macrófagos M1, mientras que en los macrófagos M2 se localiza fundamentalmente en el núcleo. Esta localización se invierte tras el estímulo con PGE₂. La localización diferencial de Nurr1 en condiciones basales y tras la exposición a un estímulo inflamatorio podría reflejar la función diferencial del receptor en ambos tipos de macrófagos.
4. La piel de pacientes con pénfigo muestra una mayor densidad de macrófagos en comparación con la de los donantes sanos, que comprende fundamentalmente macrófagos Nur⁻ y Nur^{hi}. De forma general, una expresión elevada de Nurr1 se asocia con un fenotipo inflamatorio de los macrófagos dérmicos.

PERSPECTIVAS

- 1 Evaluar la localización subcelular de Nurr1 utilizando otros factores asociados al perfil M1 y M2.
- 2 Evaluar si otros estímulos de tipo Th2 generan el mismo efecto observado con IL-4 y TGF- β 1.
- 3 Evaluar la expresión de Nurr1 en muestras de tejido de otras patologías inflamatorias de tipo Th2.

REFERENCIAS

- 1 Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guilliams M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E, Jung S. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38(1):79-91, 2013.
- 2 Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122(3):787-795, 2012.
- 3 Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6:13, 2014.
- 4 Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 4(3):281-286, 2005.
- 5 Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211(6-8):609-618, 2006.
- 6 Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* 204(5):1057-1069, 2007.
- 7 Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev. Comp. Immunol.* 28(5):509-554, 2004.
- 8 Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J. Immunol.* 175(1):342-349, 2005.
- 9 Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8(12):958-969, 2008.
- 10 Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell* 140(6):871-882, 2010.
- 11 Okin D, Medzhitov R. Evolution of inflammatory diseases. *Curr. Biol.* 22(17):R733-740, 2012.
- 12 Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140(6):771-776, 2010.

- 13 Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Toews GB, Westwick J, Strieter RM. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J. Clin. Invest.* 86(6):1945-1953, 1990.
- 14 Ritchlin C. Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res.* 2(5):356-360, 2000.
- 15 Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Life Sci.* 65(19):2964-2978, 2008.
- 16 Wagner EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol. Rev.* 208:126-140, 2005.
- 17 Serra-Valdés M. Las enfermedades reumáticas: de la teoría a la realidad. *Rev. Finlay* 3(4):3, 2013.
- 18 Cervera Castillo H, Torres caballero V. Patrón de referencia y nivel de concordancia diagnóstica entre un servicio de reumatología y el primer y segundo nivel de atención médica en la zona metropolitana del DF. R. Facultad de medicina UNAM 47:002, 2004.
- 19 Venugopal S, Murrell F. Diagnosis and clinical features of pemphigus vulgaris. *J. Immunol. Allergy Clin.* 32:233-243, 2012.
- 20 Avalos E, Herrera R. Enfermedades autoinmunes de la piel. Autoinmunidad y enfermedad autoinmune, CIB, 29:373-384, 2005.
- 21 Castellanos-Íñiguez AA, Guevara-Gutiérrez E. Pénfigo vulgar. *Dermatol. Rev. Mex.* 55(2):73-83, 2011.
- 22 Ogg G, Winsey S, Wakelin S, Wojnarowska F. Immunobullous diseases. *Skin Immune System. Bos J.* 3er Ed. 24:511-526, 2005.
- 23 Fujimura T, Kakizaki A, Furudate S, Aiba S. A possible interaction between periostin and CD163+ skin-resident macrophages in pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Exp. Dermatol.* 26(12):1193-1198, 2017.
- 24 Furudate S, Fujimura T, Kambayashi Y, Kakizaki A, Aiba S. Comparison of CD163+ CD206+ M2 macrophages in the lesional skin of bullous pemphigoid

- and pemphigus vulgaris: the possible pathogenesis of bullous pemphigoid. *Dermatology* 229(4):369-378, 2014.
- 25 Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol.* 33(9):449-458, 2012.
- 26 Levi M, Wang X, Choudhury D. Nuclear hormone receptors as therapeutic targets. *Contrib. Nephrol.* 170:209-216, 2011.
- 27 Ortega-Dominguez B, Herrera-Ramirez M, Tecalco-Cruz AC. Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma. *Rev. Ciencias Químico-Biológicas.* 18(2):131-143, 2015.
- 28 Zhan YY, Chen Y, Zhang Q, Zhuang JJ, Tian M, Chen HZ, Zhang LR, Zhang HK, He JP, Wang WJ, Wu R, Wang Y, Shi C, Yang K, Li AZ, Xin YZ, Li TY, Yang JY, Zheng ZH, Yu CD, Lin SC, Chang C, Huang PQ, Lin T, Wu Q. The orphan nuclear receptor Nur77 regulates LKB1 localization and activates AMPK. *Nat. Chem. Biol.* 88(11):897-904, 2012.
- 29 Zhang P, Yang JY, Huang JL, Ma X, Li SF, Zhao JY, Hu YR, Wang YC, Gao JJ, Sha YH, Zheng L, Wang Q. Nur77 decreases atherosclerosis progression in apoE(-/-) mice fed a high-fat/high-cholesterol diet. *PLoS One* 9(1):e87313, 2014.
- 30 Pascual G, Glass CK. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol. Metab.* 17(8):321-327, 2006.
- 31 Martinez-Gonzalez J, Badimon L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc. Res.* 65(3):609-618, 2005.
- 32 Zhao Y, Bruenmmer D. NR4A orphan nuclear receptors in cardiovascular biology. *Drug. Discov. Today Dis. Mech.* 6(1-4):e43-e48, 2009.
- 33 Safe S, Jin UH, Morpurgo B, Abudayyeh A, Singh M, Tjalkens RB. Nuclear receptor 4A (NR4A) family - orphans no more. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 157:48-60, 2016.
- 34 Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252(5010):1296-1300, 1991.

- 35 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(10):5946-5951, 1997.
- 36 Perlmann T, Jansson L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.* 9(7):769-782, 1995.
- 37 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(36):33001-33011, 2002.
- 38 Palumbo-Zerr K, Zerr P, Distler A, Fliehr J, Mancuso R, Huang J, Mielenz D, Tomcik M, Fürnrohr BG, Scholtyssek C, Dees C, Beyer C, Krönke G, Metzger D, Distler O, Schett G, Distler JH. Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor- β signaling and fibrosis. *Nat. Med.* 21(2):150-158, 2015.
- 39 Maxwell MA, Muscat GE. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl. Recept. Signal.* 4:e002, 2006.
- 40 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(32):29256-29262, 2005.
- 41 Niu G, Lu L, Gan J, Zhang D, Liu J, Huang G. Dual roles of orphan nuclear receptor TR3/Nur77/NGFI-B in mediating cell survival and apoptosis. *Int Rev. Cell Mol. Biol.* 313:219-258, 2014.
- 42 Baillie JK, Arner E, Daub C, De Hoon M, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Carninci P, Forrest AR, Hayashizaki Y; FANTOM Consortium, Faulkner GJ, Wells CA, Rehli M, Pavli P, Summers KM, Hume DA. Analysis of the human monocyte-derived macrophage transcriptome and response to lipopolysaccharide provides new insights into genetic aetiology of inflammatory bowel disease. *PLoS Genet.* 13(3):e1006641, 2017.
- 43 Schott J, Reitter S, Philipp J, Haneke K, Schäfer H, Stoecklin G. Translational regulation of specific mRNAs controls feedback inhibition and survival during macrophage activation. *PLoS Genet.* 10(6):e1004368, 2014.

- 44 Zhang L, Xie F, Zhang J, Dijke PT, Zhou F. SUMO-triggered ubiquitination of NR4A1 controls macrophage cell death. *Cell Death Differ.* 24(9):1530-1539, 2017.
- 45 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(1):47-59, 2009.
- 46 Li L, Liu Y, Chen HZ, Li FW, Wu JF, Zhang HK, He JP, Xing YZ, Chen Y, Wang WJ, Tian XY, Li AZ, Zhang Q, Huang PQ, Han J, Lin T, Wu Q. Impeding the interaction between Nur77 and p38 reduces LPS-induced inflammation. *Nat. Chem. Biol.* 11(5):339-346, 2015.
- 47 Jacobs FM, van der Linden AJ, Wang Y, von Oerthel L, Sul HS, Burbach JP, Smidt MP. Identification of Dlk1, Ptpu and Kih1 as novel Nurr1 target genes in meso-diencephalic dopamine neurons. *Development* 136(14):2363-2373, 2009.
- 48 Johnson MM, Michelhaugh SK, Bouhamdan M, Schmidt CJ, Bannon MJ. The transcription factor NURR1 exerts concentration-dependent effects on target genes mediating distinct biological processes. *Front. Neurosci.* 5:135, 2011.
- 49 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.
- 50 Murphy EP, McEvoy A, Conneely OM, Bresnihan B, FitzGerald O. Involvement of the nuclear orphan receptor NURR1 in the regulation of corticotropin-releasing hormone expression and actions in human inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 44(4):782-793, 2001.
- 51 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 loading and inflammatory responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26(10):2288-2294, 2006.

- 52 Holla VR, Mann JR, Shi Q, DuBois RN. Prostaglandin E2 regulates the nuclear receptor NR4A2 in colorectal cancer. *J. Biol. Chem.* 281(5):2676-2682, 2006.
- 53 O'Kane M, Markham T, McEvoy AN, Fearon U, Veale DJ, FitzGerald O, Kirby B, Murphy EP. Increased Expression of the orphan nuclear receptor NURR1 in psoriasis and modulation following TNF- α inhibition. *J. Invest. Dermatol.* 128(2):300-310, 2008.
- 54 Doi Y, Oki S, Ozawa T, Hohjoh H, Miyake S, Yamamura T. Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105(24):8381-8386, 2008.
- 55 Davies MR, Harding CJ, Raines S, Tolley K, Parker AE, Downey-Jones M, Needham MR. Nurr1 dependent regulation of pro-inflammatory mediators in immortalised synovial fibroblasts. *J. Inflamm. (Lond)* 2:15, 2005.
- 56 Aherne CM, McMorrow J, Kane D, FitzGerald O, Mix KS, Murphy EP. Identification of NR4A2 as a transcriptional activator of IL-8 expression in human inflammatory arthritis. *Mol. Immunol.* 46(16):3345-3357, 2009.
- 57 Mix KS, McMahon K, McMorrow JP, Walkenhorst DE, Smyth AM, Petrella BL, Gogarty M, Fearon U, Veale D, Attur MG, Abramson SB, Murphy EP. Orphan nuclear receptor NR4A2 induces synoviocyte proliferation, invasion, and matrix metalloproteinase 13 transcription. *Arthritis Reum.* 64(7):2126-2136, 2012.
- 58 Merino-Zamorano C, Hernández-Guillamon M, Jullienne A, Le Béhot A, Bardou I, Parés M, Fernández-Cárdenas I, Giralt D, Carrera C, Ribó M, Vivien D, Ali C, Rosell A, Montaner J. NURR1 involvement in recombinant tissue-type plasminogen activator treatment complications after ischemic stroke. *Stroke* 46(2):477-484, 2015.
- 59 Zhao Y, Howatt DA, Gizard F, Nomiya T, Findeisen HM, Heywood EB, Jones KL, Conneely OM, Daugherty A, Bruemmer D. Deficiency of the NR4A orphan nuclear receptor NOR1 decreases monocyte adhesion and atherosclerosis. *Circ. Res.* 107(4):501-511, 2010.

- 60 Shao Q, Shen LH, Hu LH, Pu J, Qi MY, Li WQ, Tian FJ, Jing Q, He B. Nuclear receptor Nur77 suppresses inflammatory response dependent on COX-2 in macrophages induced by oxLDL. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49(2):304-311, 2010.
- 61 You B, Jiang YY, Chen S, Yan G, Sun J. The orphan nuclear receptor Nur77 suppresses endothelial cell activation through induction of IkappaBalpha expression. *Circ. Res.* 104(6):742-749, 2009.
- 62 Mix KS, Attur MG, Al-Mussawir H, Abramson SB, Brinckerhoff CE, Murphy EP. Transcriptional repression of matrix metalloproteinase gene expression by the orphan nuclear receptor NURR1 in cartilage. *J. Biol. Chem.* 282(13):9492-9504, 2007.
- 63 Lammi J, Huppunen J, Aarnisalo P. Regulation of the osteopontin gene by the orphan nuclear receptor NURR1 in osteoblasts. *Mol. Endocrinol.* 18(6):1546-1557, 2004.
- 64 Mahajan S, Saini A, Chandra V, Nanduri R, Kalra R, Bhagyaraj E, Khatri N, Gupta P. Nuclear receptor Nr4a2 promotes alternative polarization of macrophages and confers protection in sepsis. *J. Biol. Chem.* 290(30):18304-18314, 2015.
- 65 Diatchenko L, Romanov S, Malinina I, Clarke J, Tchivilev I, Li X, Makarov SS. Identification of novel mediators of NF-kappaB through genome-wide survey of monocyte adherence-induced genes. *J. Leukoc. Biol.* 78(6):1366-1377, 2005.
- 66 Wang J, Yang ZH, Chen H, Li HH, Chen LY, Zhu Z, Zou Y, Ding CC, Yang J, He ZW. Nemo-like kinase as a negative regulator of nuclear receptor Nurr1 gene transcription in prostate cancer. *BMC Cancer* 16:257, 2016.
- 67 Han Y and Cao G. Role of nuclear receptor NR4A2 in gastrointestinal inflammation and cancers. *World J. Gastroenterol.* 18(47):6865-6873, 2012.
- 68 Ke N, Claassen G, Yu DH, Albers A, Fan W, Tan P, Grifman M, Hu X, Defife K, Nguy V, Meyhack B, Brachat A, Wong-Staal F, Li QX. Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis. *Cancer Res.* 64:8208-8212, 2004.

- 69 Inamoto T, Papineni S, Chintharlapalli S, Cho SD, Safe S, Kamat AM. 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-chlorophenyl)methane activates the orphan nuclear receptor Nurr1 and inhibits bladder cancer growth. *Mol. Cancer Ther.* 7:3825-3833, 2008.
- 70 Smith AG, Lim W, Pearen M, Muscat GE, Sturm RA Regulation of NR4A nuclear receptor expression by oncogenic BRAF in melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24:551-563, 2011.
- 71 Llopis S, Singleton B, Duplessis T, Carrier L, Rowan B, Williams C. Dichotomous roles for the orphan nuclear receptor NURR1 in breast cancer. *BMC Cancer* 3:139, 2013.
- 72 González-Domínguez É, Domínguez-Soto Á, Nieto C, Flores-Sevilla JL, Pacheco-Blanco M, Campos-Peña V, Meraz-Ríos MA, Vega MA, Corbí AL, Sánchez-Torres C. Atypical activin A and IL-10 production impairs human CD16+ monocyte differentiation into anti-Inflammatory macrophages. *J. Immunol.* 196(3):1327-1337, 2016.
- 73 González-Domínguez É, Samaniego R, Flores-Sevilla JL, Campos-Campos SF, Gómez-Campos G, Salas A, Campos-Peña V, Corbí AL, Sánchez-Mateos P, Sánchez-Torres C. CD163L1 and CLEC5A discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 98:453-456, 2015.
- 74 Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 29(43): 13435-13444, 2009.
- 75 Relloso M, Puig-Kröger A, Muñoz O, Rodríguez-Fernández J, De la Rosa G, Longo N, Navarro J, Muñoz-Fernández M, Sánchez-Mateos P, Corbí AL. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF- β , and anti-Inflammatory agents. *J. Immunol.* 168(6):2634-2643, 2002.
- 76 Puig-Kröger A, Sierra-Filardi E, Domínguez-Soto A, Samaniego R, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Ratnam M, Sánchez-Mateos P, Corbí AL. Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes

- a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer Res.* 69(24):9395-9403, 2009.
- 77 Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukoc. Biol.* 79(2):285-293, 2006.
- 78 Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* 5 514, 2014.
- 79 Inamoto T, Czerniak BA, Dinney CP, Kamat AM. Cytoplasmic mislocalization of the orphan nuclear receptor Nurr1 is a prognostic factor in bladder cancer. *Cancer* 116:340-346, 2010.
- 80 Garcia-Yagüe ÁJ, Rada P, Rojo AI, Lastres-Becker I, Cuadrado A. Nuclear import and export signals control the subcellular localization of Nurr1 protein in response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 288:5506-5517, 2013.
- 81 Watanabe T, Sekine S, Naguro I, Sekine Y, Ichijo H. Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1)-p38 Pathway-dependent Cytoplasmic Translocation of the Orphan Nuclear Receptor NR4A2 Is Required for Oxidative Stress-induced Necrosis. *J. Biol. Chem.* 290(17): 10791-10803, 2015.
- 82 Wang J, Yang J, Li BB, He ZW. High cytoplasmic expression of the orphan nuclear receptor NR4A2 predicts poor survival in nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14(5):2805-2809, 2013.
- 83 Alvarez-Castelao B, Losada F, Ahicart P, Castaño JG. The N-terminal region of Nurr1 (a.a 1-31) is essential for its efficient degradation by the ubiquitin proteasome pathway. *PLoS One* 8(2):e55999, 2013.