



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Zacatenco
Departamento de Biomedicina Molecular

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

TESIS

Que presenta:

M.C. Eduardo Patiño Martínez

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

Directora de la tesis:

Dra. María Carmen Sánchez Torres

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

COMITÉ TUTORIAL

Directora de tesis:
Dra. Ma. Carmen Sánchez Torres

Asesores:

Dra. Ma. Teresa Estrada García
Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda
Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Vianey Ortiz Navarrete
Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Emilio Joaquín Cordova Alarcón
Instituto Nacional de Medicina Genómica, INMEGEN

El M.C. Eduardo Patiño Martínez realizó esta tesis de doctorado con una beca otorgada por CONACYT (No. 299431)

AGRADECIMIENTOS

- Al CONACYT por el apoyo económico facilitado a través de la beca No. 299431 para el desarrollo de estudios de doctorado.
- Al CINVESTAV por la permitirme formar parte de esta institución y realizar mis estudios de doctorado.
- Al Banco de Sangre del centro Médico Nacional “La Raza” y al Centro Nacional de Transfusión sanguínea por las facilidades para la adquisición de los concentrados leucocitarios utilizados en el desarrollo de este trabajo.
- A la Dra. María Carmen Sánchez por ser parte fundamental en esta etapa de mi formación con sus enseñanzas, consejos y paciencia.
- A mis asesores: por todas las observaciones y sugerencias compartidas para mejorar este proyecto.
- A María de Jesús Maqueda, Ninfa Arreola y Julio Ramírez por su apoyo y excelente trabajo.
- A mis padres Gloria Martínez Gaytán y Sergio Patiño Martínez, mi motivación y ejemplo a seguir. Gracias por el apoyo, pero sobre todo por el cariño y la entrega que nos brindan día a día para hacer de mí y mis hermanos mejores personas.
- A mis hermanos Sergio, Omar y Andrea a los cuales les brindo mi admiración y respeto.
- A mis compañeros de laboratorio Angélica, Adrián, Pepe, Gustavo, Eduardo, Erika, Miguel y Ramón por su amistad y aportes al presente trabajo.
- A los Doctores y compañeros del Departamento de Biomedicina por la disponibilidad para el uso de sus instalaciones e instrumentación.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	4
RESUMEN EN ESPAÑOL	5
RESUMEN EN INGLÉS	6
I.- ANTECEDENTES.....	7
1.1 Inflamación	7
1.2 Macrófagos en inflamación	7
1.3 Polarización de los macrófagos	9
1.4 Diferenciación de los monocitos humanos con GM-CSF y M-CSF	11
1.5 El receptor nuclear Nur77	13
1.6 Nur77 en la respuesta inflamatoria	15
II.-JUSTIFICACIÓN	21
III.-HIPÓTESIS.....	21
IV.-OBJETIVO GENERAL.....	21
V.-OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
VI.-MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Aislamiento de monocitos	22
6.2 Generación de macrófagos GM y M	22
6.3 Ensayos de Western blot	22
6.4 Determinación de citocinas en los sobrenadantes de macrófagos GM y M	23
6.5 Extracción de ARN	23
VII.-RESULTADOS	25
7.1 Macrófagos pro y anti – inflamatorios expresan Nur77	25
7.2 Nur77 es inducido en respuesta a la activación de TLR	26
7.3 Csn-B induce la actividad transcripcional de Nur77 en macrófagos pro y antiinflamatorios	29
7.4 Nur77 suprime la respuesta inflamatoria inducida tras la activación del TLR-4	30
VIII.-DISCUSIÓN	32
IX.-CONCLUSIONES.....	39
X.-PERSPECTIVAS	40
XI.-BIBLIOGRAFÍA.....	41

ABREVIATURAS

Ab: anticuerpo

COX: ciclooxigenasa

CRP: proteína C reactiva

Csn-B: cytosporone B

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

IFN: interferón

I κ B: inhibidor de κ B

IL: interleucina

LPS: lipopolisacárido bacteriano

MACS: Magnetic Cell Sorting

MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos

MCP: proteína quimioattractante de monocitos

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos

M ϕ : macrófago

M ϕ -GM: macrófagos generados con GM-CSF

M ϕ -M: macrófagos generados con M-CSF

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

NF- κ B: factor nuclear κ B

NOS: sintasa de óxido nítrico

NurRE: elemento de respuesta a Nurr

oxLDL: lipoproteína de baja densidad oxidada

PAMP: patrón molecular asociado a patógenos

PGN: peptidoglicano

Poli (I:C): ácido poliinosínico-policitídílico

PBS: Buffer salino de fosfatos

qRT-PCR: PCR cuantitativa

siRNA: RNA pequeños de interferencia

SFB: suero fetal bovino

SR-A: receptor *scavenger A*

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

TLR: receptor tipo Toll

TNF: factor de necrosis tumoral

NR4A1^{-/-}: *NR4A1* Knock out mice

RESUMEN EN ESPAÑOL

Nur77 también llamado *NR4A1*, pertenece a la subfamilia de receptores nucleares huérfanos NR4A. Está involucrado en diversos procesos como inflamación, proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Los estímulos como el lipopolisacárido (LPS) y el factor de necrosis tumoral (TNF) aumentan la expresión de Nur77 en macrófagos (M ϕ) humanos y murinos, lo que sugiere que Nur77 tiene un papel en la respuesta inflamatoria. Varios reportes han propuesto a Nur77 como un factor anti-inflamatorio. En ese contexto, encontramos que los niveles basales de ARNm de Nur77 se encuentran incrementados en los M ϕ anti-inflamatorios (generados con M-CSF, M ϕ -M), en comparación con los M ϕ proinflamatorios (generados con GM-CSF, M ϕ -GM), diferencia que se mantiene durante la diferenciación de monocito a macrófago. Sin embargo, a pesar de estas diferencias de expresión, el ARNm de Nur77 tiene una mayor vida media en los M ϕ -GM (45.7 min) con respecto a los M ϕ -M (19.0 min). En cuanto a su inducción por estímulos pro-inflamatorios (PGN, Poly I:C y LPS), Nur77 es rápidamente inducido a nivel de ARNm en los M ϕ -M (1h), mientras que en los M ϕ -GM la inducción es más tardía (4h), a pesar de la rápida caída en los niveles de mRNA, los niveles proteicos son rápidamente inducidos solo en la población de M ϕ -M (1h), a diferencia de los M ϕ -GM con una inducción tardía (8h). A nivel de ARNm, las vías de señalización que participan en esta inducción son principalmente las vías de la Mitogen-activated Protein Kinase, (MAPK, específicamente p38) y la vía de NF(Nuclear Factor) - κ B, mientras que la cinasa c-Jun N-terminal kinase (JNK) lo regulan negativamente. Además, evaluamos el papel de Nur77 en ambas poblaciones de M ϕ , encontrando que su función se asocia con la resolución de la inflamación, ya que la activación de Nur77 con su agonista (Cytosporone B, Csn-B) incrementa los niveles basales de ARNm de Nur77 en ambas poblaciones, y tras el estímulo con LPS y Csn-B incrementa los niveles de ARNm de *IFNB* solamente en M ϕ -M, mientras que de manera importante disminuye la producción de TNF e IL-6 en M ϕ -GM. Lo que sugiere una fuerte asociación de este factor de transcripción con el perfil anti-inflamatorio.

RESUMEN EN INGLÉS

Nur77 also called NR4A1, belongs to the subfamily of orphan nuclear receptors NR4A. It is involved in various processes such as inflammation, proliferation, differentiation and cell survival. Stimuli such as lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor (TNF) increase Nur77 expression in human and murine macrophages (M ϕ), suggesting that Nur77 plays a role in the inflammatory response. Several reports have proposed that Nur77 is an anti-inflammatory factor. In this context, we found that the basal levels of Nur77 mRNA are increased in differentiated anti-inflammatory M ϕ s (generated with Macrophage colony stimulating factor, M ϕ -M) compared to the M ϕ proinflammatory (generated with granulocyte/monocytes colony stimulating factor, M ϕ -GM), a difference that is maintained during monocyte to macrophage differentiation. However, despite these differences in expression, the Nur77 mRNA has a longer half-life in the M ϕ -GM (45.7 min) compared to the M ϕ -M (19.0 min). While induction by pro-inflammatory stimuli, Nur77 mRNA is rapidly induced in response to different PAMPs (4h in M ϕ -GM and 1h in M ϕ -M) at the mRNA level, while protein levels are rapidly induced only in the population of M ϕ -M (1h), unlike M ϕ -GM with a late induction (8h). The signaling pathways that participate on mRNA induction are mainly the Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK, specifically p38) pathway and the NF (Nuclear Factor) - κ B pathway, while c-Jun N-terminal kinase (JNK) regulate it negatively. In addition, we evaluate the role of Nur77 in both populations of M ϕ , finding that its function is associated with the resolution of inflammation, since the activation of Nur77 with its agonist (Cytosporone B, Csn-B) increases the basal mRNA levels of Nur77 in both populations, and after stimulation with LPS and Csn-B increases the levels of *IFNB* mRNA only in M ϕ -M, while significantly decreases the production of TNF and IL-6 in M ϕ -GM. Which suggests a strong association of this transcription factor with the anti-inflammatory profile.

I.- ANTECEDENTES

1.1 Inflamación

La inflamación es una respuesta biológica a la infección, daño tisular o desórdenes autoinmunes, que termina con la restauración de la homeostasis del tejido. La respuesta inflamatoria se caracteriza por el reclutamiento, proliferación y activación de una variedad de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas y que incluyen neutrófilos, macrófagos (M ϕ), células linfoides innatas, células NK, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, y que juntas constituyen la respuesta celular que orchestra la reparación de tejidos ¹. A nivel molecular, la inflamación se caracteriza por la activación de distintas vías de señalización que culminan en la activación de diferentes factores de transcripción como los factores nucleares (NF)- κ B, las proteínas activadoras (AP)-1 y los factores reguladores de interferón (IRF), por mencionar algunos. La activación de estos factores de transcripción, conlleva a la liberación de citocinas y quimiocinas que desencadenan mecanismos de defensa contra patógenos y promueven el reclutamiento de leucocitos a las zonas de inflamación ¹⁻⁴. 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 (ROS, ej: NADPH oxidasas) y de nitrógeno (ej: sintasa inducible del óxido nítrico -iNOS-). Esta misma señalización también induce la expresión de genes que controlan y finalizan la inflamación para asegurar la reparación del tejido y la restauración de la homeostasis ⁵.

1.2 Macrófagos en inflamación

Los macrófagos son células derivadas de médula ósea que representan la primera línea de defensa contra los patógenos. En un tejido en homeostasis, los macrófagos se encuentran en contacto continuo con el microambiente con el objetivo de desencadenar una rápida respuesta en presencia de un antígeno ⁶. Junto con las células dendríticas, los macrófagos son esenciales para coordinar las repuestas del tipo innato y adaptativo ⁷. Para la clasificación de estas células se han abordado distintos sistemas, siendo el más aceptado el conocido como “Sistema fagocítico mononuclear”, descrito por primera vez en 1972 por van Furth y colaboradores. Este sistema incluye a todas las células mononucleares altamente fagocíticas y sus progenitores de la médula ósea ⁸. Este sistema, establece que las células mononucleares se originan a partir de progenitores de medula ósea y

posteriormente migran como monocitos a través de sangre periférica infiltrándose en diferentes tejidos, procediendo a su maduración y diferenciación a macrófagos sin capacidad de proliferación ⁹.

Sin embargo, este modelo ha sido redefinido (conservándose en casos de respuesta inflamatoria y en algunos tejidos como son el corazón, la placenta o el intestino) y ahora se conoce que, durante la embriogénesis, existen precursores provenientes del saco vitelino e hígado que dan origen a los macrófagos residentes ¹⁰. Ejemplo de lo anterior son los macrófagos de la epidermis, así como las células de Langerhans que presentan un origen compartido, procediendo tanto del hígado fetal como del saco vitelino. Otro ejemplo es la microglía, que deriva exclusivamente de los progenitores del saco vitelino. Es de destacar el caso de las células de Kupffer en el hígado y los macrófagos alveolares del pulmón, los cuales durante el estado embrionario se derivan de monocitos del hígado fetal, en tanto que después del nacimiento se mantienen de forma autónoma en condiciones homeostáticas ¹¹⁻¹³. Una vez en los tejidos, los macrófagos pueden tener diferentes funciones efectoras que van desde células altamente bactericidas, hasta promover la reparación de tejido y angiogénesis. La capacidad de modular sus respuestas efectoras viene dictada por el microambiente que los rodee, ya que los macrófagos son capaces de responder a estímulos propios como externos ^{14,15}. Cuando un antígeno se genera o alcanza la matriz del tejido conectivo, los macrófagos como primera línea de defensa, son activados por señales externas como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Debido a que los macrófagos se encuentran equipados con numerosos receptores celulares en la superficie (TLRs, lectinas) e intracelulares (NLRs) que reconocen estos PAMPs o DAMPs, la activación de estos receptores enciende vías de señalización que promueven la adquisición de funciones efectoras que ayudan a la eliminación y reparación de daño ¹⁶⁻¹⁷. Una vez activado, el macrófago libera una gran cantidad de mediadores inflamatorios como por ejemplo factor de necrosis tumoral (TNF) – α , interleucina (IL)-1 β , IL-6, CCL2, IL-8, Péptidos antimicrobianos, prostaglandinas y leucotrienos. De entre estos mediadores, destaca TNF- α como la citocina pro-inflamatoria por excelencia induciendo la activación del endotelio (incremento de ICAMs, VCAMs, E y P selectina) con el objetivo de incrementar del reclutamiento de células fagocíticas al sitio de inflamación, además induce la maduración de las células dendríticas, el incremento de la temperatura, inhibe la replicación viral e induce la muerte por apoptosis ¹⁸.

1.3 Polarización de los macrófagos

La vasta heterogeneidad funcional de los M ϕ está condicionada por el microambiente extracelular, de tal forma que las subpoblaciones de M ϕ tisulares deben adaptarse a los estímulos que reciben de las células que los rodean y, en consecuencia, modificar su programa de expresión génica de acuerdo con las necesidades específicas de cada tejido ¹⁹⁻²¹. Estos estados funcionales y marcas génicas específicas generadas en respuesta al ambiente extracelular son comúnmente llamados estados de polarización del macrófago (Fig. 1) ^{22,23}. Durante la respuesta inmune adaptativa, dos tipos de respuesta han sido descritas, una denominada Th1 con la activación de la población de células CD4+ productoras de IFN- γ y otro estado de activación denominado Th2 con la producción de citocinas como IL-4 e IL13. El perfil Th1 ha sido definido como inmunoestimulante mientras que el Th2 como inmunoregulador ²⁴; ambos regulan directa o indirectamente la respuesta de todas las células presentes en el sitio, incluyendo los M ϕ . Los estados de activación de los M ϕ en estados Th1 y Th2 han sido clasificados como M ϕ del tipo M1 y del tipo M2, respectivamente. Los primeros con características pro-inflamatorias y los segundos con características anti-inflamatorias. Ambos estados cuentan con la plasticidad como característica determinante del sistema fagocítico mononuclear, evidenciado *in vitro* e *in vivo* pasando de un perfil pro-inflamatorio hacia uno anti-inflamatorio y viceversa ^{25,27}.

La polarización de los M ϕ hacia el fenotipo M1 es inducida por exposición a interferón (IFN)- γ , y ligandos de receptores tipo Toll (TLR), como el lipopolisacárido (LPS). Sus funciones efectoras son: muerte de microorganismos intracelulares, lisis de células tumorales, secreción de citocinas inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α y polarizantes como IL-12 e IL-23, las cuales promueven la polarización de los linfocitos T cooperadores (Th) hacia los fenotipos Th1 y Th17, respectivamente, así como secreción de quimiocinas inflamatorias como CCL3, CXCL9, CXCL10, y la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) y RNS (especies reactivas de nitrógeno) ²⁸. Por otro lado, los M ϕ M2 o alternativamente activados son una población con una gran heterogeneidad, debido a que son inducidos por diferentes mediadores, como citocinas del tipo Th2 (IL-4 e IL-13), factores inmunosupresores [IL-10, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de crecimiento transformante (TGF)- β , glucocorticoides] o combinaciones de inmunocomplejos y ligandos de TLRs. Los distintos tipos de M ϕ que se generan tienen en común la elevada secreción de IL-10. Sin embargo, dependiendo

de los factores que los activen, adquieren propiedades diversas: inducen repuestas Th2 y antagonizan la generación de respuestas Th1 y Th17, inducen la diferenciación de linfocitos T reguladores (Tr1 y Treg), regulan la inflamación, la remoción de *debris* celular y la regeneración de los tejidos ²⁹. Con el afán de generar una nomenclatura que defina los grupos de M ϕ M2 se han establecido nombres específicos que se refieren a la vía de inducción, de tal forma que los M ϕ activados por IL-4 e IL-13 se denominan M ϕ M2a, mientras que los M ϕ M2b son aquellos que han sido activados mediante inmunocomplejos y agonistas de TLRs, y aquellos que han sido activados por acción de factores inmunosupresores se definen como M ϕ M2c ³⁰⁻³².

Diversos estudios han demostrado que la posibilidad de polarizar monocitos purificados de sangre periférica hacia M ϕ M1 o M ϕ M2a al incubarlos *in vitro* en presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), en el primer caso o M-CSF, en el segundo ³³.

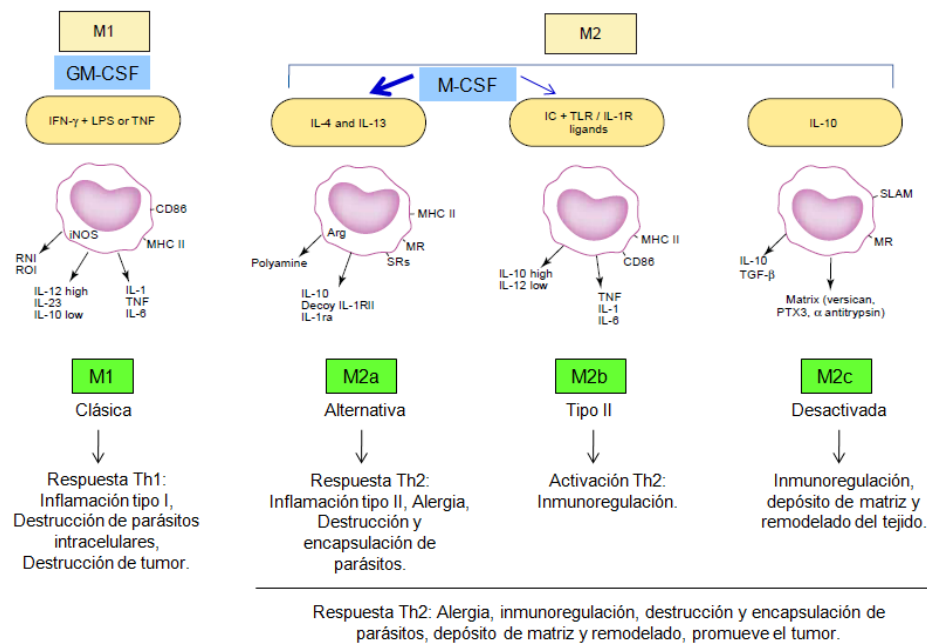


Figura 1. Inductores y propiedades funcionales de diferentes poblaciones polarizadas de los M ϕ s. Modificada de Mantovani *et al.* ²⁹

1.4 Diferenciación de los monocitos humanos con GM-CSF y M-CSF

En conjunto con la IL-3, el GM-CSF y el M-CSF son las principales citocinas que determinan el linaje macrófágico, regulando su supervivencia, diferenciación y quimiotaxis ³⁴.

El M-CSF es sintetizado por numerosos tipos celulares (células endoteliales, fibroblastos, células estromales de medula ósea, mioblastos, células tímicas epiteliales, queratinocitos, astrocitos, osteoblastos). Se encuentra en el suero en concentraciones de 3-8 ng/ml, y su producción puede ser inducida con GM-CSF, TNF, IL-1 e IFN- γ ³⁵.

Por otro lado, el GM-CSF es producido también por una gran variedad de tipos celulares, dentro de los que se incluyen linfocitos T y B, M ϕ , células polimorfonucleares, células estromales, queratinocitos, astrocitos, osteoblastos, células endoteliales y fibroblastos. Su producción requiere normalmente de la activación de estas células, pero puede ser detectado en suero bajo condiciones homeostáticas (20-100 pg/ml). Aunque su producción es local, tiene efectos importantes sobre la actividad de diversos leucocitos circulantes, y puede actuar de manera parácrina reclutando neutrófilos, monocitos y linfocitos, incrementando sus funciones en la defensa del hospedero. Por lo tanto, además de ser un factor hematopoyético, presenta características de regulador inmunológico ³⁶⁻³⁸.

El papel crítico del M-CSF en el desarrollo mieloide se comprueba en los ratones deficientes de esta citocina, los cuales carecen prácticamente de monocitos, ciertos M ϕ tisulares y de osteoclastos, mientras que los ratones deficientes de GM-CSF no exhiben grandes defectos en el linaje macrófágico ³⁶, el sistema hematopoyético de éstos es normal y los cambios más significativos residen en el desarrollo de una proteinosis alveolar debida a que los M ϕ alveolares tienen propiedades surfactantes deficientes. A partir de algunos estudios en ratones se ha postulado que el GM-CSF regula el fenotipo y función de los M ϕ alveolares. En contraste, el M-CSF regula el desarrollo de otro tipo de M ϕ , como los residentes en el peritoneo, M ϕ metalófilos de la zona marginal del bazo y M ϕ subcapsulares en los nódulos linfáticos ¹³.

Los M ϕ humanos M1 (M ϕ -GM) y M2 (M ϕ -M) generados *in vitro* tienen papeles opuestos durante las respuestas inflamatorias e inmunitarias, y estos M ϕ son considerados como anti- y pro-inflamatorios, respectivamente. Los M ϕ -M tienen una morfología elongada en forma de huso, mientras que los M ϕ -GM son más redondeados y tienen una morfología similar a un “huevo frito”. Las principales diferencias entre ambos están marcadas por las

citocinas que secretan, así como por algunos marcadores específicos de cada población. Por ejemplo, los M ϕ -GM producen IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12 p40, IL-18 e IL-23, e inducen respuestas de tipo Th1, por otro lado, los M ϕ -M liberan grandes cantidades de IL-10 y tienen una muy baja capacidad de inducir la proliferación de los linfocitos T y la secreción de IFN- γ ^{39, 40}. En cuanto a la expresión de marcadores, los M ϕ GM se caracterizan por sus altos niveles de CD1b, CD71, IL-18R, HLA-DQ y del factor de transcripción PU.1 (familia Ets), mientras que los M ϕ -M presentan una alta expresión de HLA-I, CD11c, CD14, CD16, CD32, CD115, del receptor *scavenger* CD163, del receptor de folato (FR) β y de los factores de transcripción c-maf y MAFB (familia bZip)^{38, 39}. En trabajos previos hemos descrito dos marcadores fenotípicos que permiten discriminar entre una subpoblación de M ϕ residentes con características M2, presentes mayoritariamente en biopsias de tejidos humanos sanos (el receptor *scavenger* CD163L1) y M ϕ con características M1 presentes en biopsias de tejidos inflamados, como el intestino en la enfermedad de Crohn (la lectina CLEC5A). *In vitro*, CLEC5A se expresa preferentemente en los M ϕ -GM y CD163L1 lo hace únicamente en los M ϕ -M^{41, 42}.

In vitro, ambos tipos de M ϕ responden al ser activados por LPS. Sin embargo, como ya se ha mencionado los M ϕ -GM responden con una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias, mientras que los M ϕ -M producen principalmente altas cantidades de IL-10. Además, los M ϕ -M tienen una mayor activación de la vía de las MAPKs en respuesta a LPS, esto evidenciado con la mayor fosforilación de la MAPKK p38 (datos aún no publicados). Sin embargo, los factores intrínsecos que contribuyen a esta respuesta diferencial al LPS no están del todo descritos, por lo que se cree que distintos factores de transcripción y vías señalización son encendidas de manera preferencial entre una y otra población. Al respecto, el receptor nuclear Nur77 no ha sido estudiado hasta ahora en macrófagos humanos polarizados y ha sido reportado como un regulador directo de la vía de señalización del factor nuclear (NF) - κ B (NF- κ B), por lo tanto catalogado como un factor anti-inflamatorio, que regula la producción de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión⁴³, por ello, Nur77 puede ser propuesto como una molécula interesante a ser estudiada en la respuesta inflamatoria en ambos tipos de macrófagos.

1.5 El receptor nuclear Nur77

Nur77 pertenece a la subfamilia de receptores nucleares NR4A conformada por tres diferentes receptores Nur77 (*NR4A1*), Nurr1 (*NR4A2*) y NOR1 (*NR4A3*). Estos receptores también reciben el nombre de receptores nucleares huérfanos, llamados así ya que hasta el momento ningún ligando natural ha sido identificado por lo que se cree funcionan de una manera independiente de ligando ⁴⁴⁻⁴⁷. Su estructura contiene dominios ampliamente conservados entre las diferentes familias de receptores nucleares, y consiste en un dominio de transactivación independiente de ligando (AF-1) en la región N-terminal, un dominio de unión a DNA (DBD) altamente conservado compuesto por dos dedos de zinc y un dominio de unión a ligando (LBD) que contiene un dominio de transactivación dependiente de ligando (AF-2) en su extremo C-terminal (Fig. 2), es importante aclarar que el dominio AF-2 se cree no es funcional debido a que contiene una superficie hidrofílica sobre su LBD, esto contrario al clásico orificio hidrófobo que media el reclutamiento de moléculas co-activadoras en otros receptores nucleares ⁴⁸, por ello se cree que la actividad transcripcional de Nur77 es independiente de la unión de un ligando al dominio LBD y en su lugar parece ser dependiente de la actividad co-activadora y transcripcional del dominio AF-1 ⁴⁹.

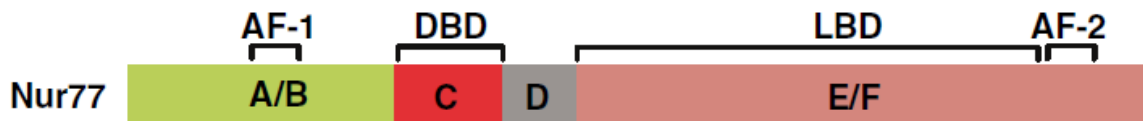


Figura 2. Representación esquemática de los dominios estructurales de Nur77. Dominio de transactivación (AF-1), Dominio de unión a DNA (DBD), Dominio de unión a Ligando (LBD) y Dominio de transactivación -2 (AF-2) ⁵⁰.

Los receptores NR4A activan la transcripción uniéndose como monómeros u homodímeros sobre secuencias consenso en el DNA de sus genes blanco (Fig. 3); una de ellas es la secuencia canónica NBRE (*nerve-growth-factor inducible gene B -NGFI-B- responsive element*) A/TAAAGGTCA ^{51,52}, mientras que los homodímeros y heterodímeros entre los miembros de la subfamilia NR4A se unen preferencialmente al elemento de respuesta a Nurr (NurRE), constituido de una secuencia relacionada a NBRE (AAATG/AC/TCA) de repetidos invertidos encontrada en el promotor del gen de pro-opiomelancortina ⁵³. Además

Nur77 y Nurr1 pueden heterodimerizar con el receptor Retinoide X (RXR) y activar la transcripción a través de un elemento DR-5 de una manera dependiente del ácido 9-cis-retinoico ^{54,55}. En un inicio se pensaba que los receptores NR4A solamente tenían actividad transcripcional, sin embargo, estudios recientes aportaron la primera evidencia de que Nurr1 puede también reprimir la transcripción de genes inflamatorios reclutando complejos co-represores ⁵⁶.

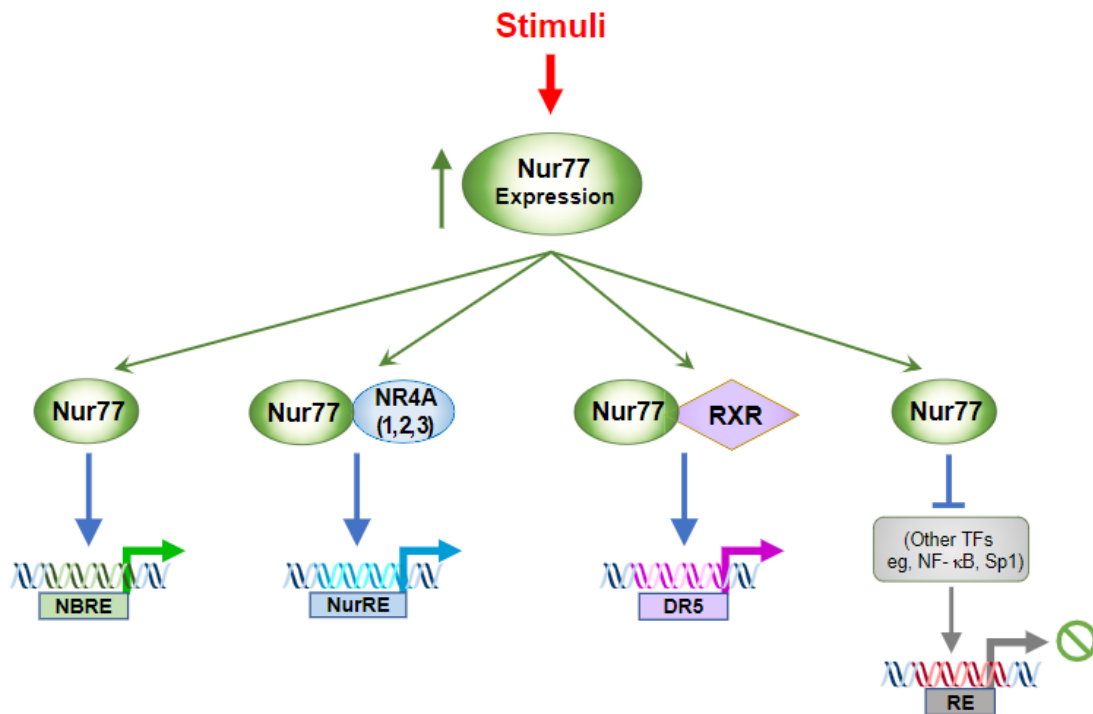


Figura 3. Reconocimiento de los elementos de respuesta a NBRE y NuRE por factores de transcripción de la familia NR4A y otros factores de transcripción ⁵⁷ (Campos-Melo D, 2013).

La inaccesibilidad del LBD de Nur77, ha sugerido que las funciones de Nur77 son reguladas principalmente a nivel de modificaciones postraduccionales. Actualmente se conoce que los tres NR4A son fosforilados en residuos de serina en respuesta a varias cinasas que se activan por factores de crecimiento, incluyendo las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3K), la proteína cinasa B (PKB/Akt), la cinasa Jun-N-terminal (JNK) y la cinasa ribosomal S6 (RSK) ⁵⁸⁻⁶¹. Ejemplo de ello, es la fosforilación de las serinas 350 y 354 dentro del dominio de unión a DNA, la cual inhibe la actividad

transcripcional de Nur77, al conferirle una carga negativa a la región DBD ^{62, 63}. Las modificaciones postraduccionales de Nur77 pueden por un lado, modular la activación de las funciones transactivacionales de Nur77 y por otro lado modificar su localización subcelular, llevándolo desde el citoplasma al núcleo (importación) o viceversa desde el núcleo hacia el citoplasma (exportación), donde también se ha reportado que Nur77 se encuentra regulando la activación de la apoptosis en linfocitos T y células cancerígenas ⁶⁴. Además, su acetilación y desacetilación por las acetil y des-acetil transferasas de histonas, se ha asociado con su estabilidad y degradación proteica, respectivamente (mecanismos de regulación postraduccionales) ⁶⁵.

En cuanto a sus funciones, Nur77 se ha propuesto como un factor de regulación metabólica debido a que su activación induce un incremento en la expresión de genes involucrados en la gluconeogénesis como glucosa-6-fosfatasa (*G6pc*), fructosa bisfosfatasa 1 (*Fbp1*), *Fbp2*, y enolasa 3 (*Eno3*), los cuales contienen secuencias NBRE en sus promotores ⁶⁶. También existen reportes donde la sobre-expresión adenoviral de Nur77 incrementa los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) mientras que disminuye los de lipoproteínas de alta densidad (HDL), además reduce los niveles hepáticos de triglicéridos. Se cree que el efecto es resultado de la represión del factor lipogénico SREBP1c ⁶⁶. Por otra parte, Nur77 regula la apoptosis de timocitos durante la selección negativa, esto a través de ser inducido por la activación del receptor de células T (TCR) donde posteriormente por un lado induce la expresión de genes apoptóticos y por otro es translocado hacia el citoplasma donde interacciona con Bcl2 en la mitocondria, desestabilizándola y activando la vía intrínseca de la apoptosis ⁶⁷.

1.6 Nur77 en la respuesta inflamatoria

Sí bien, se ha reportado que nur77 es inducido rápidamente por diversos factores de séricos como: VEGF-A, Histamina, serotonina, PAF, trombina, PDGF y EGF ⁶⁸. recientemente los miembros de la familia de receptores NR4A han emergido como potenciales reguladores de la inflamación; esto debido a su elevada expresión durante procesos inflamatorios como aterosclerosis, esclerosis y psoriasis ⁶⁹, así como su inducción en diversas líneas celulares en respuesta a estímulos como TNF- α , LPS, PMA y oxLDL ⁷⁰. Esto a través de las vías de señalización de NF- κ B y MAPK p38 ^{70, 71}.

In vitro, se ha demostrado que la expresión de todos los receptores NR4A se ve incrementada en respuesta al estímulo con LPS bacteriano o TNF sobre M ϕ derivados de

monocitos humanos (Fig. 4a), células mielomonocíticas humanas THP-1, M ϕ murinos derivados de médula ósea, M ϕ peritoneales murinos y células macrofágicas murinas RAW264.7⁷⁰. Esta expresión inducible en M ϕ se cree que depende de la activación de la señalización a través de la vía de NF- κ B, (Fig. 4b)^{70, 72}, y que se comprueba por los resultados de ensayos con genes reporteros llevados a cabo con las transfecciones de diferentes construcciones del promotor de Nur77 donde se eliminan distintos fragmentos del promotor (Fig. 4c). Actualmente en los promotores de ratón y de humano de Nur77 se han identificado secuencias de unión a NF- κ B y AP-1 altamente conservadas, y se ha confirmado la importancia de los elementos NF- κ B ya que su depleción resulta en una reducción del 50–60 % de la actividad de luciferasa⁷⁰.

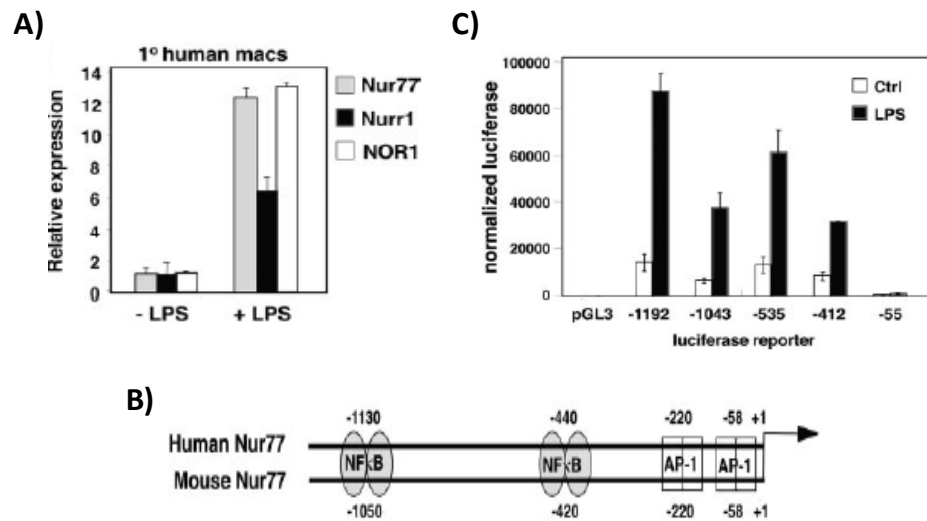


Figura 4. Análisis de la expresión de Nur77, Nurr1 y NOR1 en respuesta a LPS en M ϕ humanos. A) Expresión relativa de los receptores NR4A en M ϕ humanos derivados de monocitos tras 5 h de estimulación con LPS (500 ng/mL). B) Representación esquemática de los promotores de ratón y humano de Nur77 y sus posibles sitios de unión a NF- κ B y AP-1. C) Actividad de luciferasa en células RAW 264.7 transfectadas con las construcciones indicadas del promotor de Nur77 y tratadas con PBS o LPS (500 ng/mL) tras 18 h de estimulación⁷⁰.

Además de los estímulos como el LPS y TNF, también se ha reportado que Nur77 es inducido en células THP-1 y RAW 246.7 en respuesta a la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL), una variante de la LDL generada de manera natural por el organismo a partir de un desequilibrio en los sistemas oxidantes y antioxidantes, la cual se ha identificado como la responsable del inicio del proceso inflamatorio en la aterosclerosis^{70,71}. Sin

embargo, el mecanismo de inducción de Nur77 tras el estímulo con oxLDL no está completamente descrito. Se ha propuesto que esta inducción es mediada a través de la vía de señalización de las MAPK, específicamente p38, ya que el pretratamiento de células RAW 246.7 con un inhibidor de p38 y el posterior estímulo con oxLDL disminuye la expresión de Nur77 ⁷¹.

In vivo, el ratón *Knock out* para Nur77 (*NR4A1*^{-/-}) y de edad avanzada (8 meses) presenta un estado de inflamación sistémica, evidenciado por infiltrados celulares en tejidos como el hígado, riñón, bazo y pulmón. Además de desarrollar esplenomegalia y tener niveles séricos de IL-6 incrementados respecto al WT (Fig.5) ⁷³.

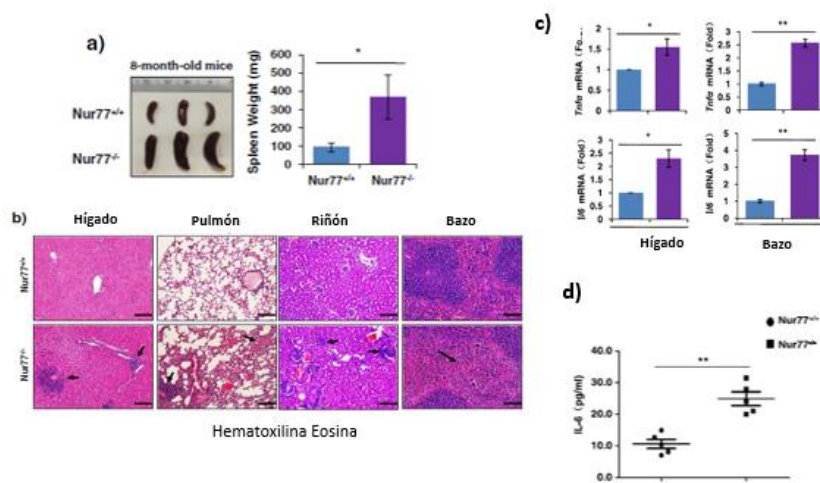


Figura 5. Los ratones *NR4A1*^{-/-} son más propensos a desarrollar inflamación sistémica. Bazos (a), tinción con hematoxilina eosina de los tejidos indicados (b), niveles de expresión de ARNm de *il6* y *tnf* en hígado y riñón (c) y niveles séricos de IL-6 pertenecientes a ratones de 8 meses de edad ⁷³.

En este contexto, otro grupo ha reportado que los ratones *NR4A1*^{-/-}, son más sensibles al choque séptico inducido por la administración de LPS, provocando una mayor muerte de ratones *NR4A1*^{-/-} con respecto a los WT, además de que los niveles séricos de TNF, IL-6, IL-1 β y óxido nítrico se encuentran incrementados con respecto al WT (Fig. 6). *In vitro*, los macrófagos peritoneales de estos mismos ratones (*NR4A1*^{-/-}) estimulados con LPS, producen una mayor cantidad de citocinas pro – inflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β) ⁷⁴.

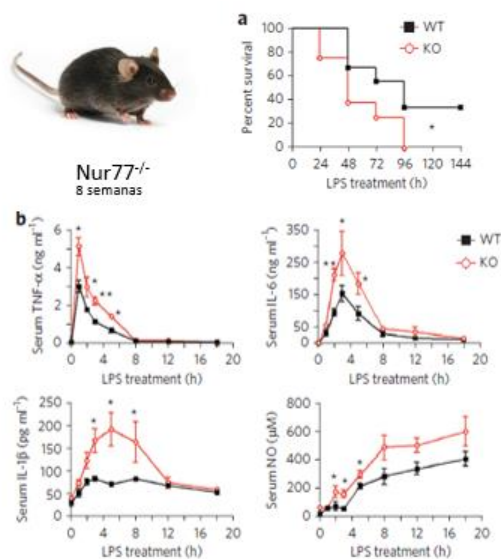


Figura 6. Los ratones deficientes de Nur77 tienen una mayor sensibilidad al desarrollo de sepsis inducida por la administración de LPS. a) sobrevivencia b) Producción de mediadores inflamatorios séricos en ratones WT y *Nur77*^{-/-}. Después de la inyección de LPS, se obtuvieron los sueros de ratones (n = 6) en los momentos indicados para el análisis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β por ELISA y de NO por bioensayo comercial ⁷⁴.

Se ha reportado que Nur77 regula la vía de NF- κ B a través de diferentes mecanismos, uno de ellos señala que la sobre-expresión de Nur77 en células HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) incrementa la expresión del inhibidor de NF- κ B (I κ B), a través de los elementos de respuesta a Nur77 presentes en el promotor de I κ B. Como consecuencia, la translocación de NF- κ B hacia el núcleo se ve disminuida y con ello la respuesta inflamatoria ⁷⁵. Al respecto, se ha reportado que la expresión de las citocinas interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-8 se vio disminuida en células THP-1 que sobre-expresaban Nur77 estimuladas con LPS o TNF. Tanto los niveles de ARNm como de proteína se vieron disminuidos en comparación con las células THP-1 control tranfectadas con los vectores vacíos (mock) y posteriormente estimuladas con LPS o TNF. Este efecto se revirtió cuando se utilizaron RNA pequeños de interferencia (siRNA) dirigidos contra Nur77 o NOR-1, incrementándose la expresión de IL-1 β e IL-8, además de incrementarse la proteína quimioattractante de monocitos (MCP)-1 ⁷⁶.

Otro de los mecanismos propuestos para la regulación negativa de la inflamación mediada por Nur77, es la interacción entre nur77 y p65, una de las subunidades que pueden formar parte del complejo NF- κ B. En un estado basal esta interacción impide la unión de p65 a los

elementos de respuesta a NF- κ B presentes en los promotores de sus genes blancos. Sin embargo, tras la activación de la vía de TLR – 4, la activación de la MAPKKK p38 fosforila a Nur77 en una región del sitio de unión a ligando liberando así a p65 y permitiendo la regulación de sus genes blancos, entre los que destacan los de carácter pro – inflamatorio (Fig. 7) ⁷⁴.

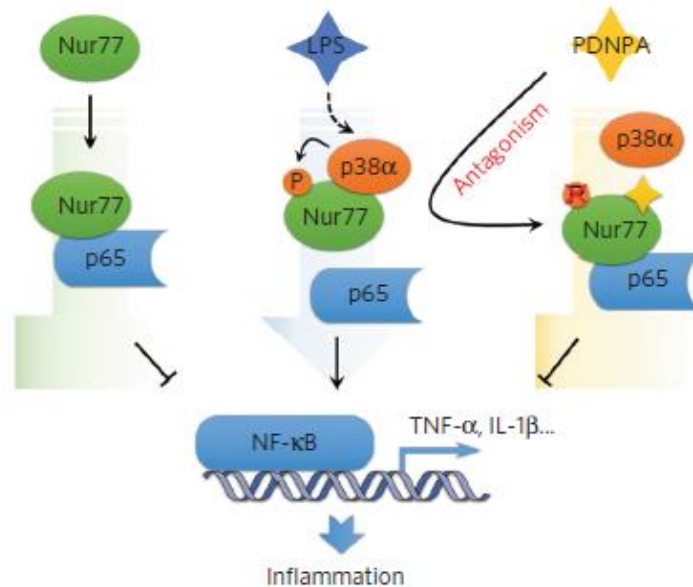


Figura 7. Nur77 inhibe la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B. Nur77 interactúa con la subunidad p65 a través de su dominio de transactivación N-terminal. Cuando las células son estimuladas con LPS se induce la activación de la cinasa p38, que a su vez se une al LBD de Nur77 y fosforila los residuos Thr²⁷ y Thr¹⁴³ de Nur77, propiciando la liberación de la subunidad p65 y por lo tanto liberando a p65 para su unión con los elementos de respuesta a NF- κ B. La fosforilación de Nur77 puede ser inhibida mediante el compuesto n-pentil 2-[3,5-dihidroxi-2-(1-nonanoil) fenil] acetato (PDNPA), el cual se une a Nur77 y bloquea el sitio de unión a p38, lo que a su vez impide la liberación de p65 y por lo tanto impidiendo la expresión de genes pro-inflamatorios ⁷⁴.

En un estado con baja expresión de Nur77 (*NR4A1*^{-/-}), existiría una mayor cantidad de complejos NF- κ B disponibles que se traducen en una mayor expresión de moléculas con carácter pro-inflamatorio. Definir los mecanismos de regulación permitiría que moléculas como el PDNPA sean utilizadas para la regulación de procesos inflamatorios crónicos.

Por otro lado, en un modelo de estudio de colitis experimental, también se ha reportado la interacción directa de Nur77 con el factor asociado al receptor de TNF (TRAF) - 6, esta

interacción impide la ubiquitinación de TRAF-6, la cual es necesaria para la interacción entre TRAF-6 y TAK1 para la correcta señalización y activación de la vía de NF- κ B (Fig. 8)⁷⁷.

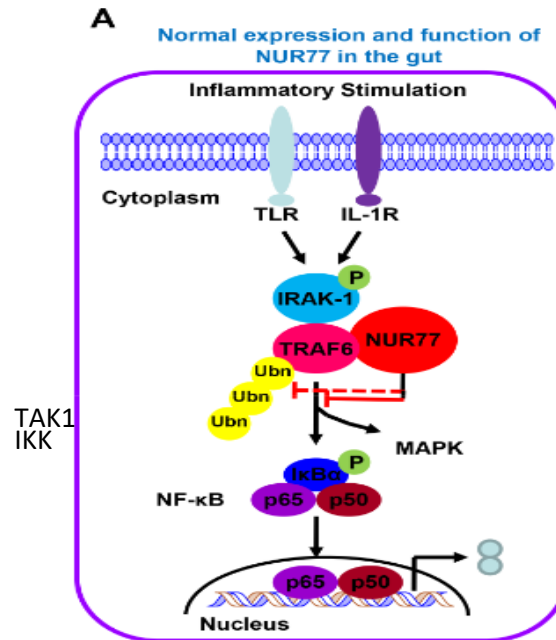


Figura 8. Modelo de la regulación de la señalización de TLR-IL-1R mediada por Nur77 en enfermedad inflamatoria intestinal. De manera normal la activación de la vía TLR-IL-1R es inhibida por Nur77 mediante su interacción con TRAF-6: La interacción impide la oligomerización y ubiquitinación de TRAF-6 y con ello la subsecuente activación de NF- κ B y la producción de citocinas pro-inflamatorias. Cuando la expresión de Nur77 está disminuida existe una activación exacerbada de la vía TLR-IL-1R que conlleva a la activación excesiva de NF- κ B y a la producción de citocinas pro-inflamatorias⁷⁷.

II.-JUSTIFICACIÓN

Los M ϕ polarizados M1 (GM) y M2 (M) responden a LPS de manera diferencial, los primeros con una mayor producción de factores pro-inflamatorios, mientras que los M ϕ M2 presentan un claro perfil anti-inflamatorio. Sin embargo, los factores que contribuyen a esta respuesta diferencial están sólo parcialmente descritos. Recientemente, el factor nuclear Nur77 ha surgido como un factor anti-inflamatorio que limita la inflamación por mecanismos que involucran la inactivación de NF-kB p65. Además, su ausencia se ha asociado con una respuesta inflamatoria exacerbada en sepsis, aterosclerosis y colitis. Al respecto, se ha reportado que, en algunas enfermedades inflamatorias crónicas, la población de macrófagos predominante es la M1 o pro-inflamatoria (GM). Por lo que el conocimiento de la actividad y función del receptor Nur77 en la respuesta inflamatoria en macrófagos polarizados, podría servir para proponer a Nur77 como blanco terapéutico.

III.-HIPÓTESIS

Nur77 regula la respuesta inflamatoria de los macrófagos polarizados con GM-CSF y M-CSF

IV.-OBJETIVO GENERAL

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

V.-OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar la expresión del ARNm de Nur77 en macrófagos polarizados con GM y M-CSF.
- 2.- Evaluar la vida media del ARNm de Nur77 en macrófagos polarizados con GM y M-CSF.
- 3.- Evaluar la expresión de Nur77 en respuesta a estímulos pro-inflamatorios como LPS, Poli I:C y PGN, así como las vías de señalización que conllevan a su inducción.
- 4.- Evaluar el efecto de la activación de Nur77 sobre la síntesis de algunos genes regulados por Nur77.
- 5.- Analizar el efecto de la activación de Nur77 sobre la producción de citocinas en los macrófagos estimulados con LPS

VI.-MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Aislamiento de monocitos

Los concentrados leucocitarios fueron obtenidos a partir de donantes sanos del Banco de Sangre del CMN "La Raza" del IMSS y el Centro Nacional de Transfusión Sanguínea. Las células fueron sometidas a un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (densidad 1.077 g/mL). Las células fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 30 min a temperatura ambiente y se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La población de monocitos CD14+ fue purificada mediante selección positiva MACS (*Magnetic Cell Sorting*) utilizando un anticuerpo (Ab) anti-CD14 conjugado con microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec).

6.2 Generación de macrófagos GM y M

Los monocitos CD14+ se cultivaron a una densidad de 0.7×10^6 células/ml en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM y antibióticos 1%. El medio fue suplementado con GM-CSF (1000 U/ml, ProBiomed) o con M-CSF premium grade (10 ng/ml, Miltenyi Biotec) para inducir la diferenciación de los monocitos hacia M ϕ de tipo GM y M respectivamente ⁷⁸. Las citocinas se adicionaron al tiempo 0, día 2 y día 4. Una vez alcanzado el sexto día los M ϕ maduros fueron sometidos a diversos estímulos a diversos tiempos según lo requerido. Los siguientes reactivos fueron utilizados: Cytosporone B (Csn-B, 1 μ g/mL, Sigma Aldrich) Lipopolisacárido (LPS, *Escherichia coli* 0111:B4, 100 ng/ml, Sigma Aldrich), peptidoglicano (PGN, 10 μ g/mL), ácido poliinosínico-policitídílico [Poli (I:C), Invivogen, 50 μ g/mL], BIRB0796 (0.1 μ M) como inhibidor de p38MAKP, U0126 (2.5 μ M) como inhibidor de MEK, SP600125 (30 μ M) como inhibidor de JNK y BAY-117082 (10 μ M, Sigma Aldrich) como inhibidor de NF- κ B.

6.3 Ensayos de Western blot

Los lisados totales se obtuvieron con SDS 5 %, sonicados y centrifugados a 14,000 rpm por 30 min. El sobrenadante se recuperó y posteriormente se cuantificó la cantidad de proteína obtenida mediante el kit DC Protein Assay Reagent (BioRad). 30 μ g de proteína fue diluida en buffer de carga para su posterior resolución en geles SDS-PAGE al 10% bajo condiciones reductoras. A continuación, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con TBS-T (Tris 0.2 M, NaCl 1.37 M, 0.1% Tween 20) y leche en polvo al 5%, lavadas con TBS-T, e incubadas con los Ab primarios anti-Nur77 (Cat. Sc-365113, Santa Cruz Biotech, dilución 1:1000), o Anti- γ -Tubulina (Cat. T5326, Sigma Aldrich, dilución 1:1000) diluidos en TBS-T con BSA 0.1% durante toda la

noche a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-T e incubadas con los correspondientes Ab secundarios conjugados a peroxidasa (Dako). La reacción se reveló mediante el sistema de quimioluminiscencia Immun-Star™ (BioRad Laboratories).

6.4 Determinación de citocinas en los sobrenadantes de macrófagos GM y M

Los M ϕ fueron cultivados a una densidad de 0.7×10^6 células/ml en placas de 48 pozos. Una vez alcanzado el sexto día de diferenciación, los M ϕ fueron sometidos a los siguientes estímulos: LPS (100 ng/mL) en presencia o ausencia de Csn-B (1 μ g/mL) durante 18 h. Una vez terminado los tiempos de estimulación el sobrenadante fue recolectado y guardado a -80°C hasta su análisis mediante kit de ELISA comerciales (BD Biosciences) para TNF, IL-10, IL-6 e IL-8.

6.5 Extracción de ARN

Una vez recolectadas las células, la extracción de ARN se realizó con el reactivo Trizol® (Ambion). Se añadieron 250 μ L de trizol a $5-7 \times 10^6$ células. Posteriormente, la mezcla se agitó en vórtex y se conservó 5 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C y se obtuvo la fase acuosa, a la cual se le añadieron 125 μ L de isopropanol, se mezcló por inmersión y se incubó 10 min a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. A continuación, se adicionaron 250 μ L de etanol 75 %, se mezcló y se centrifugó nuevamente a 8,000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y se añadieron nuevamente 125 μ L de isopropanol, se mezcló por inmersión y se incubó 10 min a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. A continuación, se adicionaron 250 μ L de etanol 75 %, se mezcló y se centrifugó nuevamente a 8,000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el ARN se resuspendió en 15 μ L de agua-DEPC. El ARN se incubó a 60°C por 10 min y finalmente se cuantificó y evaluó su integridad en un gel de agarosa al 1 %. Se tomaron 1000 ng de RNA y se procedió con la generación de cDNA utilizando el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis.

El análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando las sondas y oligonucleótidos prediseñados de Applied Biosystems (TaqMan® Gene Expression Assays) en el sistema 7500 de Applied Biosystems, bajo las siguientes condiciones:

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

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

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

$$\Delta\Delta Ct_{(\text{condición 1} - \text{condición 2})} = (\Delta Ct_{\text{gen-TBP}})_{\text{condición 1}} - (\Delta Ct_{\text{gen-TBP}})_{\text{condición 2}}$$

Análisis estadístico

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

VII.-RESULTADOS

7.1 Macrófagos pro y anti – inflamatorios expresan Nur77

Debido a su asociación con el perfil anti-inflamatorio, primero decidimos evaluar la expresión de ARNm de Nur77 en M ϕ -GM y M ϕ -M (Materiales y métodos) obtenidos a partir de monocitos de 25 donantes sanos. Una vez diferenciados, al sexto día evaluamos por qRT-PCR y encontramos una mayor expresión de ARNm de Nur77 en M ϕ -M (Fig. 9A). Como la diferenciación de los macrófagos a partir monocitos humanos toma seis días, decidimos evaluar la expresión de ARNm de Nur77 en monocitos, al primero, tercero y sexto día (Fig. 9B). Encontramos que los monocitos no diferenciados expresan altos niveles de ARNm de Nur77, similares a los niveles encontrados en M ϕ -M al sexto día. En ambas poblaciones, en relación con los niveles detectados en monocitos, los niveles de ARNm de Nur77 disminuyen drásticamente el primer día, para luego, al tercer día aumentar de manera muy significativa. Los M ϕ -GM alcanza sus niveles más altos en este punto (tercer día), incluso alcanzando niveles más altos que los encontrados en los M ϕ -M. A partir del tercer día, los niveles de ARNm en los M ϕ -GM disminuyen hasta alcanzar el sexto día, mientras que en los M ϕ -M continúan aumentando hasta alcanzar los niveles encontrados en monocitos (T0). Debido a la mayor expresión en los M ϕ -M, decidimos evaluar si existen diferencias en la vida media del ARNm entre ambas poblaciones (Fig. 9C). Tratamos a los macrófagos con un inhibidor de la transcripción, Actinomicina D (5 μ g / mL) durante los tiempos indicados y posteriormente a través de qRT-PCR se evaluaron los niveles de ARNm. Inesperadamente, encontramos un tiempo de vida media más alto en M ϕ -GM de 45.7 min y de 19.0 min para M ϕ -M (Fig. 9C).

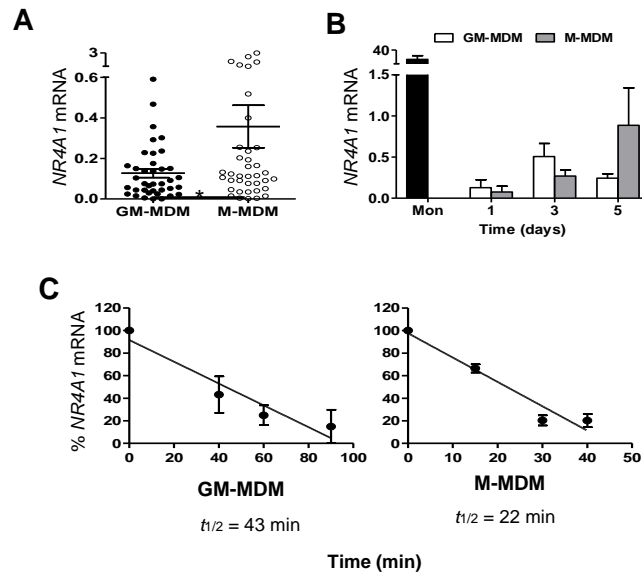


Figura. 9 Expresión del ARNm de Nur77 en macrófagos GM y M. Los monocitos primarios se cultivaron en presencia de GM-CSF y M-CSF durante seis días (M ϕ -GM y M ϕ -M), al sexto día se evaluó la expresión de Nur77 a través de qRT-PCR (A). La expresión de Nur77 también se evaluó durante la diferenciación de macrófagos en T0, primero, tercero y sexto día por qRT-PCR (B). Para la determinación de la vida media de ARNm de Nur77, M ϕ -GM y M ϕ -M se trataron con Actinomicina D (5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) en los tiempos indicados y los niveles de ARNm se evaluaron por qRT-PCR (C). La vida media se calculó utilizando la ecuación de la recta. Expresión relativa de ARNm a TBP. Estadísticas: prueba t de dos colas emparejada. * $p = <0.05$.

7.2 Nur77 es inducido en respuesta a la activación de TLR

Debido a que se ha reportado que la expresión de Nur77 se induce en respuesta a diferentes estímulos proinflamatorios ⁷⁰, decidimos evaluar la expresión del ARNm de Nur77 después de la activación de TLR-2, 3 y 4 a los tiempos indicados para cada población (Fig. 10A). Nur77 en M ϕ -M se induce rápidamente después de la activación de TLR-3 y 4 alcanzando el pico de expresión en tan solo una hora, mientras que tras la activación de TLR-2, el pico de expresión se alcanza a las dos horas. De manera interesante, la inducción de Nur77 en, M ϕ -GM fue más tardía con respecto a la observada en M ϕ -M, ya que el pico de expresión para todos los PAMPs se observó a las cuatro horas. Los resultados en los M ϕ -M coinciden con informes anteriores en los que Nur77 se induce rápidamente y tiene

una rápida caída alcanzando los niveles basales en tan solo dos horas. Posteriormente, debido a que TLR-4 señala por las vías de TRIF y MyD88, decidimos comparar los niveles alcanzados en los picos de inducción entre ambas poblaciones después de la activación con los distintos PAMPs, y observamos que, de una a cuatro horas, los niveles alcanzados en los M ϕ -M siempre son más altos que los encontrados en M ϕ -GM (Fig. 10B, se muestran los valores de expresión relativos a la expresión en M ϕ -GM). Cuando analizamos los niveles de proteína (Fig. 10C), detectamos una baja expresión de Nur77 a nivel basal en ambas poblaciones, sin embargo, después de la activación de TLR-4, Nur77 se induce rápidamente en los M ϕ -M (una hora) y continúa aumentando hasta las ocho horas, mientras que la inducción de proteína en los M ϕ -GM es tardía y se observa un incremento hasta las ocho horas.

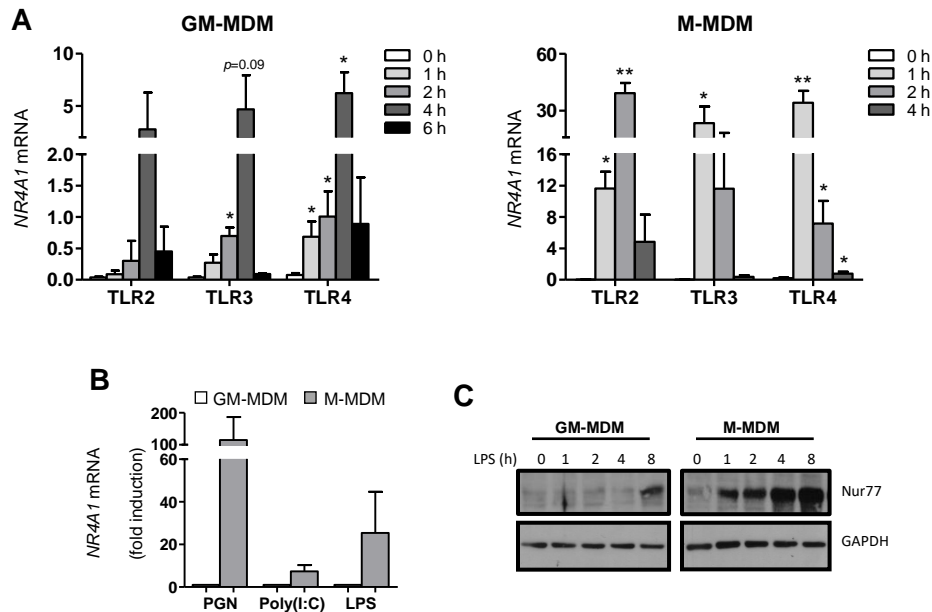


Figura. 10. LPS induce la sobreexpresión de Nur77 en macrófagos M-CSF. Al sexto día de diferenciación los macrófagos se estimularon con PGN (10 μ g / ml), Poli I: C (50 μ g / ml) o LPS (100 ng / ml) a los tiempos indicados, la expresión de ARNm de Nur77 se evaluó mediante qRT-PCR (A). Comparación de los niveles de ARNm de Nur77 entre los picos de expresión de M ϕ -GM y M después de la activación con PGN, Poli I:C y LPS (B). Expresión de proteína (C) de Nur77 en M ϕ -GM y M tratados con LPS (100 ng / ml) a los tiempos indicados. expresión de ARNm. ref. Estadísticas: prueba t de dos colas emparejada * $p < 0.05$

Como se ha reportado, Nur77 es inducido a través de la activación de la vía NF- κ B⁷⁰ y MAPK⁷¹. Debido a esto, decidimos inhibir las dos principales vías activadas después de la activación de TLR-4 (vías NF- κ B y MAPKs). Los macrófagos fueron pretratados durante una hora con el inhibidor p38MAPK BIRB0796 (0.1 μ M), el inhibidor MEK U0126 (2.5 μ M), el inhibidor JNK SP600125 (30 μ M) y el inhibidor NF- κ B BAY-117082 (10 μ M) antes del tratamiento con LPS (Fig. 11). Encontramos una reducción significativa en la expresión del ARNm de Nur77 en presencia del inhibidor de NF- κ B a las cuatro horas en M ϕ -GM y una disminución importante pero no significativa a una hora en M ϕ -M. El efecto principal en la reducción de Nur77 se observó en presencia del inhibidor de p38, reduciendo la expresión de Nur77 en una y dos horas solo para M ϕ -M. No encontramos ningún efecto sobre la inhibición de MEK, por lo que ERK1 / 2 parece no participar en la inducción de Nur77. Además, encontramos un efecto de inducción solo en M ϕ -M cuando se inhibe JNK, este resultado es interesante ya que no hay informes asociados entre la señalización de JNK y la expresión de Nur77.

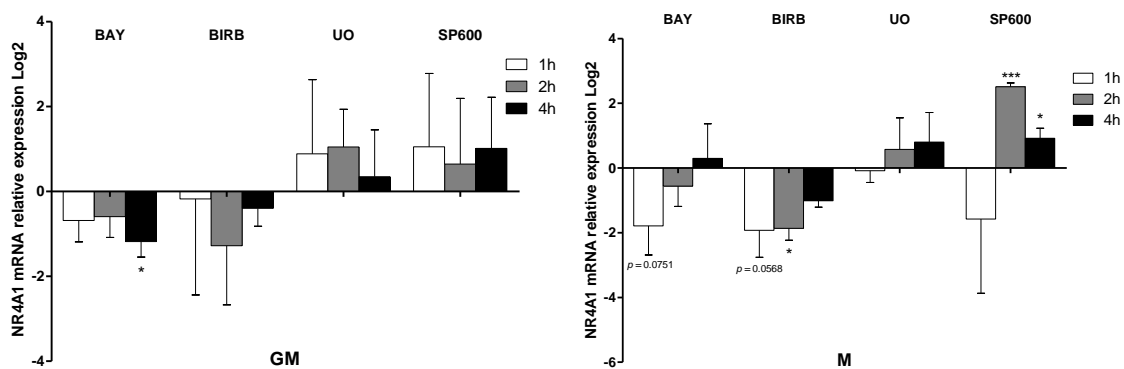


Figura. 11. NF- κ B y MAPK p38, contribuye a la inducción de Nur77 después de la activación de TLR-4 en macrófagos M-CSF. Expresión del ARNm de Nur77 tras el pretratamiento una hora con el inhibidor de MAPK p38 BIRB0796 (0.1 μ M), el inhibidor de MEK U0126 (2.5 μ M), el inhibidor de JNK SP600125 (30 μ M) o el inhibidor de NF- κ B BAY-117082 (10 μ M) y la estimulación con LPS (100 ng / mL) durante 1, 2 o 4 horas. Expresión relativa de ARNm. Estadísticas: prueba t de dos colas emparejada * p < 0.05

7.3 Csn-B induce la actividad transcripcional de Nur77 en macrófagos pro y antiinflamatorios

A continuación, decidimos evaluar el efecto de la transactivación de Nur77 a través de su activación con un agonista específico, el Cytosporone B (Csn-B), que interactúa en la Tyr 453 del LBD y aumenta la actividad transcripcional de Nur77 induciendo así su interacción con los coactivadores del receptor de esteroides (SRC-1) y SRC-2)³⁰. Para nuestro objetivo, estimulamos ambas clases de macrófagos con Csn-B (1 µg / ml) durante dos horas y evaluamos la expresión de *NR4A1*, *CD36*, *MSR1*, *TNF*, *IL6*, *CCL2* e *IL10*, algunos de los genes reportados como genes diana de Nur77 (Fig. 12). Encontramos en ambas poblaciones una inducción del ARNm de Nur77 en ambas poblaciones, estos resultados evidencian la activación de Nur77 en nuestro sistema de polarización utilizando un agonista. Observamos un aumento en *TNF* e *IL10* a las 12 horas en Mφ-GM, mientras que en Mφ-M observamos una disminución en la expresión de *IL6*. Estos resultados demuestran que la actividad transcripcional de Nur77 puede ser activada por Csn-B en nuestro sistema, por esa razón y debido a que la activación de Nur77 inhibe la respuesta del LPS (ligando TLR-4), decidimos tratar a los Mφ-GM y M con LPS en presencia de Csn-B.

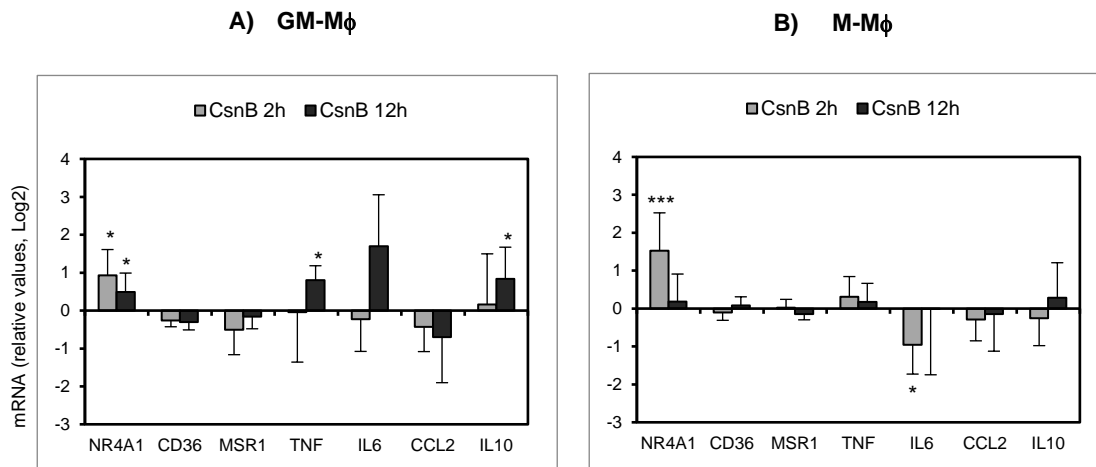


Figura. 12. Activación Nur77 en Mφ-GM y M. Mφ-GM (A) y Mφ-M (B) se trataron o no con agonista de Nur77 Csn-B (1 µg / mL). La expresión de *NR4A1*, *CD36*, *MSR1*, *TNF*, *IL6*, *CCL2*, e *IL-10* se evaluó mediante RT-qPCR. Los niveles de ARNm son relativos a la expresión en los macrófagos tratados con DMSO. Expresión relativa de ARNm a TBP. Estadísticas: prueba t de dos colas emparejada. * p = <0.05

7.4 Nur77 suprime la respuesta inflamatoria inducida tras la activación del TLR-4

Con el objetivo de determinar si la activación de Nur77 (tratamiento con Csn-B) podría modular la respuesta inflamatoria en macrófagos humanos polarizados, decidimos estimular ambas poblaciones con LPS (100 ng / ml) y al mismo tiempo activar Nur77 con su agonista, el Csn-B. Evaluamos la producción de algunas citocinas y quimiocinas, además de ICAM1 (un gen señalado como gen blanco de Nur77) a las 2 y 12 horas (para la expresión de ARNm) (Fig. 13) y para los niveles de proteína a las 18 horas (Fig. 14). A nivel de ARNm esperábamos una disminución de las citocinas del tipo pro-inflamatorio, sin embargo, en citocinas como IL-6 e IL-1 β en M ϕ -GM, se observa una clara tendencia a incrementar a las 12 h, al igual que TNF en los M ϕ -M, mientras que de manera importante en estos macrófagos encontramos un incremento significativo a las 12 h en los niveles de IFN- β , una citocina encargada de la respuesta antiviral.

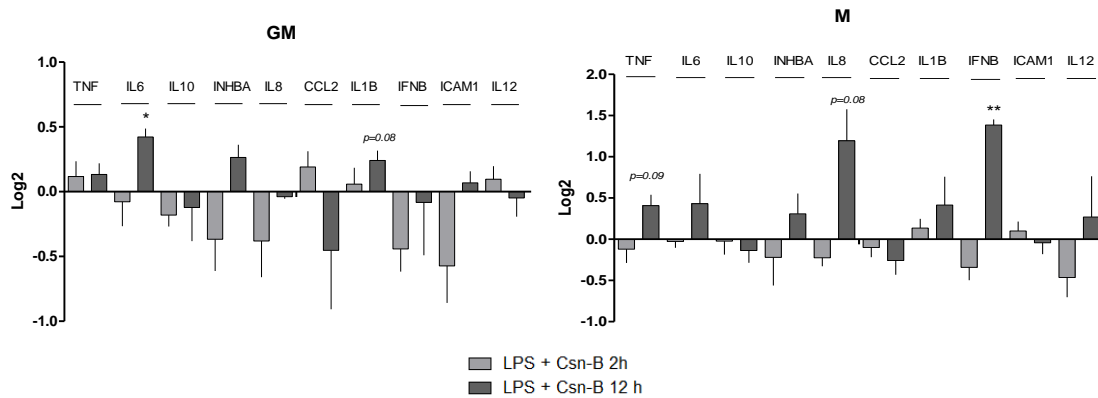


Figura. 13. Nur77 regula la expresión de *IFNB* tras la activación de TLR-4. Expresión de ARNm en M ϕ -GM (A) y M ϕ -M (B) tratados con LPS (100 ng / ml) en presencia o ausencia de Csn-B (1 μ g / ml) a los tiempos indicados. Los valores representan los cambios relativos con respecto a la expresión basal. Estadísticas: prueba t de dos colas emparejada * p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.0005.

En cuanto a los niveles proteicos, encontramos una reducción importante en la producción de TNF- α en ambas poblaciones. La expresión de IL-10 parece aumentar en un nivel no significativo en M ϕ -M, mientras que en los M ϕ -GM aumenta de manera importante. La expresión de IL-6, IL-8, e IL-1 β se regula negativamente en M ϕ -GM (Fig. 14). Estos

resultados confirman por primera vez los efectos anti-inflamatorios de Nur77 después de la activación de Csn-B en un sistema de polarización de macrófagos humanos, con una importante regulación sobre el perfil de citocinas en macrófagos proinflamatorios.

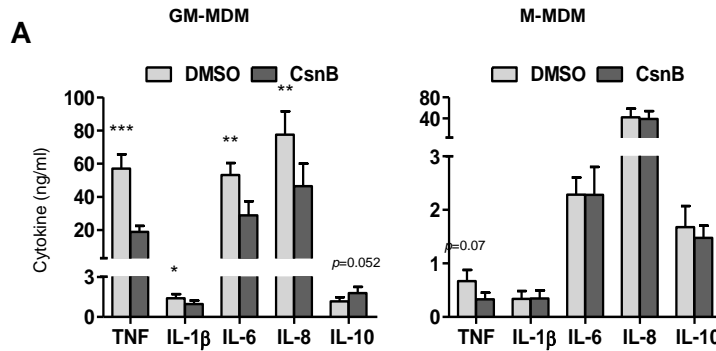


Figura. 14. Nur77 regula la respuesta inflamatoria inducida tras la activación de TLR-4. Niveles proteicos de TNF, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10 en Mφ-GM y M tratados con LPS (100 ng / ml) en presencia o ausencia de Csn-B (1 μg / ml) a los tiempos indicados. Los valores de proteínas fueron relativos a los macrófagos estimulados con LPS. Estadísticas: prueba t de dos colas emparejada * p <0.05, ** p <0.005, *** p <0.0005.

Realizar el Knock down de Nur77 previo a la estimulación con LPS en estas células evidenciaría si Nur77 es indispensable para regular la respuesta inflamatoria en los Mφ-M, sin embargo, durante los intentos realizados durante este trabajo, no nos fue posible disminuir la expresión de Nur77, muy probablemente debido a los mecanismos altamente sensibles y específicos sobre la regulación postranscripcional que existe sobre su ARNm⁷⁹ y la fuerte inducción en respuesta a la activación de TLR-4 (Fig.10).

VIII.-DISCUSIÓN

El estudio de la respuesta inflamatoria ha permitido identificar citocinas, factores de crecimiento y células, que promueven y participan en la inflamación. Sin embargo, los mediadores de la transcripción que se activan en respuesta a señales proinflamatorias y que también conducen a la resolución de la inflamación se han descrito solo parcialmente. En este contexto, a Nur77 se le ha atribuido un papel anti-inflamatorio, según los reportes en los que la sobreexpresión de Nur77 en células THP-1 reduce los niveles de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1 β e IL-8 después de la estimulación con LPS o TNF, mientras que la disminución en la expresión de Nur77 revierte este efecto ⁸⁰. Además, *in vivo* la deficiencia de Nur77 ha evidenciado las funciones anti-inflamatorias y ateroprotectoras de Nur77, dado que los ratones deficientes en Nur77 inyectados por vía intraperitoneal con LPS tienen una mayor susceptibilidad a morir por choque séptico ^{74,81}.

Nuestros resultados apoyan la teoría de Nur77 como factor anti-inflamatorio. Primero, nuestro grupo de investigación encontró que los M ϕ -M (anti-inflamatorios) tienen una mayor expresión basal de ARNm de Nur77 con respecto a los macrófagos proinflamatorios (GM-M ϕ) (Fig. 9A). En relación con estos resultados, hay informes que proponen a Nur77 como factor maestro de diferenciación y supervivencia de monocitos murinos, específicamente de la población Ly6C-, una población celular llamada "monocitos patrulleros" que después de atravesar el endotelio, alcanzan el tejido y se polarizan hacia un fenotipo "M2-like" (anti-inflamatorio) ⁷⁶, y que *in vivo* producen grandes cantidades de IL-10 tras una infección bacteriana ⁸². Mientras que la deficiencia de Nur77 en ratones knock-out *NR4A1* (*NR4A1*^{-/-}) de edad avanzada (8 meses), polariza a los macrófagos hacia un fenotipo M1 proinflamatorio con un aumento en los niveles del ARNm de *tnf*, *il6*, *cxcl11*, *indo* (marcadores M1) ⁷³. Además, los ratones *NR4A1*^{-/-} exhiben una deficiencia selectiva de estos monocitos "patrulleros", lo que demuestra la importancia de Nur77 en el desarrollo de esta población ⁷⁶. Otro grupo informa que una sub-población de monocitos humanos (clasificados en tres grupos, basados en la expresión de CD14 y CD16) presentan una expresión diferencial de Nur77 a nivel de ARNm, encontrando que los monocitos CD14+CD16- con características proinflamatorias y una alta respuesta a LPS, tienen una expresión más baja del ARNm de Nur77, mientras que la población de CD14dimCD16+, análoga a los monocitos "patrulleros" de Ly6C- en ratones, tiene una mayor expresión de Nur77 y una menor respuesta a LPS (evidenciado por la menor producción de TNF- α) ^{83,84}, una respuesta muy similar al de los M ϕ -M evaluados en el presente trabajo.

Estos y nuestros resultados proporcionan evidencia adicional sobre el papel de Nur77 durante la diferenciación de monocitos y su asociación con el perfil anti-inflamatorio. Con el objetivo de observar cómo se expresa el ARNm de Nur77 durante la diferenciación de monocitos hacia macrófagos (Fig. 9B), evaluamos la expresión del ARNm de Nur77 en monocitos humanos totales y encontramos una mayor expresión en estos con respecto a los macrófagos de día seis. La mayor expresión de Nur77 en estas células puede deberse a los distintos factores séricos, en relación a esto, se ha reportado que la activación del receptor A2a, un receptor de adenosina, induce la expresión de todos miembros de la familia NR4A en PBMC humanos ⁸⁵, además la adherencia de monocitos sobre placas de cultivo plásticas induce la expresión de todos los miembros de la familia NR4A ⁸⁶, también los niveles de lípidos en suero se correlacionan con una mayor expresión de ARNm de Nur77 en monocitos totales ⁸⁷, es decir, elevados niveles séricos de lípidos parecen inducir la expresión de Nur77 tanto a nivel de ARNm como proteico. Otros factores séricos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la trombina, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la histamina, el factor de activación de plaquetas (PAF) y la serotonina ^{68, 88} también se ha reportado inducen la expresión de Nur77. Por lo tanto, no descartamos que esta alta expresión se deba al contacto previo con estos factores. De hecho, la serotonina podría ser un inductor directo y que favorezca la expresión de Nur77 en nuestro sistema, debido a la fuerte asociación entre la serotonina y la polarización alternativa hacia M ϕ -M, ya que se ha reportado que la señalización de 5-hidroxitriptamina a través de los receptores de serotonina (Receptor de Hidroxitriptamina 2B, HTR2B y el Receptor Hidroxitriptamina 7, HTR7), regula positivamente los genes asociados a la polarización M2 (*SERPINB2*, *THBS1*, *STAB1*, *COL23A1*), y reduce la expresión de los genes asociados a M1 (*INHBA*, *CCR2*, *MMP12*, *SERPINE1*, *CD1B*, *ALDH1A2*) ⁸⁹. Sin embargo, no se ha estudiado una relación directa entre la serotonina y la expresión de Nur77 en M ϕ . Aunque, sí se ha reportado que la expresión del receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF-1R, receptor del M-CSF) está regulada directamente por Nur77 ⁹⁰, hasta el momento no se ha reportado que Nur77 se ha inducido en respuesta a la señalización por M-CSF, por lo que no descartamos que uno de los factores inductores de Nur77 en nuestro sistema sea el propio M-CSF. Durante la diferenciación de macrófagos, también encontramos una mayor expresión del ARNm de Nur77 en los M-M ϕ , por lo que nos preguntamos si habría diferencias en la estabilidad de ARNm entre ambas poblaciones. Como ya se mencionó, el ARNm de Nur77 tiene una vida media mayor en los M ϕ -GM (45,7 min) que la encontrada en los M ϕ -M (19,0 min) (Fig. 9C), en este aspecto, se ha reportado que la vida media del

ARNm de Nur77 es aproximadamente de 25 minutos en linfocitos humanos activados por co-estimulación con α CD3 + α CD28⁹¹, además esto concuerda con la vida media de otros genes de respuesta temprana (como Nur77) que también tienen una vida media muy corta. Estos genes como FOS, JUN y MYC, tienen secuencias específicas en su 3'UTR, llamados elementos Ricos en Uridina Adenilato (ARE) que regulan la desintegración de ARNm a través de su interacción con proteínas de unión de AREs, promoviendo la des-adenilación y degradación del ARNm por la actividad exonucleasa 3'-5' de los exosomas^{92, 93}. Construcciones fusionando los 3'UTR de genes de respuesta temprana (como lo es Nur77) con un ARNm estable como el de la β -globina, incrementa la inestabilidad del ARNm, corroborando así, que las regiones 3'UTR contienen las secuencias que regulan la estabilidad. Debido a que se han encontrado AREs en el NR4A1 3'UTR⁽⁹²⁾ y logramos detectar el ARNm de Nur77 en estado basal, a pesar de su rápida tasa de degradación, esto nos hace pensar que la rápida degradación está equilibrada por una rápida transcripción. Sin embargo, determinar esto requiere de otras técnicas (Run-ON) que no han sido abordadas en el presente trabajo. En el contexto de los mecanismos de regulación post-transcripcional, recientemente se ha reportado que la expresión de una isoforma de NR4A2 (Nurr1) está regulada por miARNs, específicamente por miR-93, miR-204 y miR-302. Estos miARN reconocen secuencias específicas en el 3-UTR y median su degradación⁹⁴. En cuanto a Nur77, la estabilización de su ARNm es regulada por ARN largos no codificantes (lncARN) (esto reportado en tejidos de cáncer colorrectal (CCR)), específicamente el NR4A1AS (un lncARN) estabiliza el ARNm de Nur77 mediante la formación de complejos de ARN-ARN mediante emparejamiento parcial de bases y por lo tanto aumentando su expresión⁹⁵. En el presente trabajo no hemos evaluado estos aspectos a profundidad, sin embargo, no descartamos que las diferencias encontradas en la vida media del ARNm entre ambas poblaciones de M ϕ , puedan deberse a la expresión diferencial de miRNA y lncRNAs encargados de regular la expresión del ARNm de Nur77 entre ambas poblaciones. Además, sería interesante encontrar las proteínas (Proteínas de unión a AREs) o ARNs que regulan su estabilidad a través de su interacción sobre el 3'UTR. Debido a que se ha reportado que la expresión de Nur77 es inducida por diferentes estímulos proinflamatorios como LPS y TNF- α en células THP-1, monocitos humanos primarios, macrófagos murinos⁷⁰, oxLDL en macrófagos murinos⁷¹ y PGF2 en células lúteas⁹⁶. En el presente trabajo decidimos evaluar este aspecto, encontrando que Nur77 es inducido tras la activación de distintos TLR (2, 3 y 4) en ambas poblaciones de M ϕ . Ya que Nur77 se ha clasificado como un gen de respuesta temprana, con una inducción rápida

(minutos), alcanzando sus niveles más altos en una hora y disminuyendo a niveles basales en las próximas dos horas ⁹⁷, nosotros esperábamos encontrar este comportamiento en ambas poblaciones, sin embargo, a diferencia de las propiedades reportadas para genes de respuesta temprana, en los M ϕ -GM la inducción de Nur77 es tardía y alcanza sus niveles más altos a las cuatro horas (Fig. 10). La inducción tardía observada en M ϕ -GM podría estar asociada con un estado inaccesible del promotor en esta población, con marcas epigenéticas de represión, impidiendo por lo tanto su transcripción. En este sentido, se ha reportado que el promotor Nur77 a nivel epigenético está regulado positivamente por marcas de cromatina abiertas como la acetilación de la histona H3 en pacientes con hipercolesterolemia ⁸⁵, una marca epigenética abierta que podría encontrarse enriquecida en la población M ϕ -M, y explicaría la mayor y rápida inducción en respuesta a los diferentes PAMPS en comparación con los M ϕ -GM, sin embargo, por ahora, no se han descrito marcas epigenéticas en el promotor Nur77 en un sistema como el nuestro, por lo que es ampliamente recomendable estudiar a profundidad este aspecto. Tampoco descartamos que señales secundarias a la activación del TLR-4 (producción de moléculas inductoras de Nur77) sean las responsables de esta inducción. Otro aspecto a considerar son las vías de señalización y factores de transcripción preferencialmente activos en una población respecto de otra, por ejemplo se ha encontrado que la vía de NF κ B se encuentra principalmente activa en los M ϕ -GM ⁹⁸ lo que favorecería la mayor y rápida inducción de Nur77 en esta población, sin embargo esto no es así (inducción tardía), contrario a esto, en los M ϕ -M vías como las de las MAPKs ⁹⁹ y factores de transcripción como los miembros de la familia AP-1, CREB, CEBP y MEF2 que favorecen la expresión de Nur77 en otros sistemas ^{70,100}, se encuentran mayormente expresados o activos (MEF2) en esta población (datos propios no publicados). MEF2 destaca como uno de los factores de transcripción que regulan directamente la expresión de Nur77 ¹⁰⁰, por lo que no descartamos que en nuestro sistema pudiera tener un papel relevante favoreciendo la expresión de Nur77 en los M ϕ -M. Comparando los niveles de ARNm y proteicos de Nur77 tras la activación del TLR-4, encontramos una gran inducción a ambos niveles en la población de M ϕ -M con respecto a los M ϕ -GM (Fig. 10). Esto no se ha reportado hasta ahora y correlaciona perfectamente con el perfil anti-inflamatorio de los M ϕ -M. Estas diferencias entre los niveles de ARNm y proteína, con una inducción transitoria y una rápida caída del ARNm, además de niveles sostenidos de inducción proteica hasta las 8 h, no son ajenos a Nur77. Ya que se ha reportado, que la traducción del ARNm de Nur77 en respuesta a LPS en macrófagos murinos está mediada principalmente por proteínas de unión a AREs, que se asocian sobre

el 3'-UTR y favorecen una rápida y sostenida velocidad de traducción. Sin embargo, las proteínas involucradas y que pudieran regular la traducción del ARNm de Nur77 no se han identificado hasta el momento, al respecto es importante destacar que diferentes inhibidores de la inflamación a nivel de la vía de NF- κ B (Nfkbid, Nfkbiz, Nr4a1, Ier3), un antagonista de p38 MAPK (Dusp1) y supresores postranscripcionales de la expresión de citocinas (Zfp36 y Zc3h12a) son regulados de esta misma manera ⁷⁹ Debido a la importancia de los sitios AREs, que al parecer juegan un papel importante en la regulación de estas proteínas, no sería raro que las proteínas de unión a AREs pudieran jugar un papel determinante en la mayor inducción de Nur77 en los M ϕ -M, por ejemplo ya se ha reportado que Zfp36 (una proteína de unión a AREs) se encuentra más expresada en los M ϕ -M con respecto a los M ϕ -GM y que además favorece la degradación del ARNm de *TNF* ⁹⁸ por lo que no sería raro que Nur77 estuviera regulado de manera diferencial por estas proteínas en nuestro sistema. De acuerdo con una mayor inducción de Nur77 en respuesta a LPS en M ϕ -M también encontramos que esta inducción es mediada principalmente a través de la vía NF- κ B y MAPKs (p38) (Fig. 11). En este contexto, en otros sistemas se ha reportado que ambas vías de señalización contribuyen con su expresión ^{70, 71}. Sin embargo, sí bien las vías de NF κ B y p38 inducen la expresión del ARNm de Nur77, JNK (c-Jun N-terminal kinase) otra MAPK activada tras la activación del TLR-4, inhibe su expresión en M ϕ -M (Fig. 11), al respecto no existen reportes que relacionen la expresión del ARNm de Nur77 y la activación de JNK, sin embargo, a nivel proteico si existen reportes donde la fosforilación de Nur77 mediada por JNK, induce su exportación nuclear ¹⁰¹, ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma ¹⁰². Cabe mencionar que en otros sistemas las MAPKs han sido asociadas como mediadores de la estabilidad de ARNm a través de fosforilar proteínas de unión a AREs ¹⁰³, dada la importancia de estas secuencias para la expresión y regulación de Nur77, no descartamos que la activación de p38 y JNK jueguen un papel importante en la inducción diferencial de Nur77 en nuestro sistema, estabilizando o desestabilizando el ARNm.

Hasta el momento se han descrito distintos mecanismos por los cuales Nur77 ejerce sus efectos anti-inflamatorios. Uno de ellos es directamente a través de su actividad transcripcional que regula la expresión de genes anti o pro-inflamatorios ^{72,104-106}. En este aspecto, algunos esfuerzos dirigidos a responder esta pregunta se han basado en el uso del agonista de Nur77 (Csn-B), que se sabe induce las actividades transcripcionales de Nur77, aumentando así la propia expresión de Nur77 debido a los elementos de respuesta a Nur (NBRE) presentes en su promotor ⁷⁵ lo que ha sido verificado en nuestro sistema (Fig. 12). Los reportes hasta el momento muestran el posible papel de Nur77 en la regulación de

la expresión de ciertos genes, ya sea aumentando o disminuyendo su expresión. En este sentido, Hu *et al.* ha reportado que la estimulación de las células THP-1 con oxLDL en presencia de Csn-B, da como resultado una disminución de la expresión de genes inflamatorios como IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF, proteína C reactiva (CRP), ICAM-1, VCAM-1 y NF- κ B, a la vez que favorecen el aumento de TGF- β y CD40¹⁰⁴. Estos resultados sugieren un papel de Nur77 como activador o represor de estos genes. Por otro lado, Pei *et al.* reportan que un gen diana de Nur77 es la quinasa inducible IKKi / IKK ϵ , que tiene la función de fosforilar el factor de respuesta al interferón (IRF) -3 y mediar la respuesta antiviral⁽⁷²⁾, asociando así la expresión de Nur77 con la respuesta inmune. Por lo tanto, parece ser que la vía NF- κ B no es la única vía que regula Nur77, ya que el tratamiento con Csn-B controla la infección por el virus de la influenza y mejora la función pulmonar en ratones infectados, esto a través de aumentar la fosforilación del factor de respuesta al interferón (IRF) -3 y, por lo tanto, la producción de IFN tipo 1^{72,105}, lo que explicaría nuestros resultados encontrados en los M ϕ -M (Fig. 13), donde tras el estímulo con LPS, los niveles del ARNm de IFNB se incrementan en presencia de Csn-B. Nuestros resultados usando Csn-B como agonista de Nur77, después de la activación con LPS han mostrado una disminución importante en la expresión de TNF e IL-6 después de la estimulación con el ligando de TLR-4 (LPS) (Fig. 14). Una posible explicación para este resultado sería que a través de la activación de los dominios de transactivación de Nur77, este es capaz de actuar como un represor sobre la expresión de TNF e IL-6. Sin embargo, hasta el momento no hay reportes que sugieran la presencia de NBRE o NurRE en el promotor TNF y que puedan ser reconocidos por Nur77 y que, por lo tanto, ejerza un efecto de represión. Debe recordarse que el Csn-B aumenta las actividades transcripcionales de Nur77⁷⁵ y por lo tanto su propia expresión, por lo que, los efectos no solo podrían deberse a la actividad transcripcional de Nur77 sino también a un aumento en la cantidad de Nur77. Ya existen reportes en células Jurkat que sugieren una interacción de Nur77 con las subunidades de NF- κ B p65 y c-Rel; Las interacciones de Nur77 con p65 evitan su unión a los elementos de respuesta a NF- κ B presentes en los promotores de citocinas como IL-2 e IL-8, en los que se ha demostrado que se unen preferentemente los homodímeros p65 o c-Rel, o los heterodímeros p65 - c - Rel¹⁰⁷. Además, recientemente se ha demostrado que la interacción entre Nur77 y p65 disminuye la expresión de TNF, IL-6, IL-1 β y óxido nítrico tras el tratamiento con el compuesto químico, n-pentil 2- [3,5-dihidroxi - 2- (1-nonanoil) -fenil] acetato (PDNPA) que estabiliza la interacción Nur77-p65, esto en macrófagos murinos⁷⁴. Nuestros resultados de momento corroboran el papel anti-inflamatorio de Nur77 y mantienen abierta la posibilidad

sobre qué Nur77 esté regulando la expresión de TNF- α a través de la inhibición directa sobre NF- κ B, lo que resulta en una disminución en la expresión de otras moléculas como IL-6. Otro grupo ha reportado que existe una interacción Nur77-TRAF-6, esta interacción impide la ubiquitinación de TRAF-6 y, por lo tanto, su interacción con el factor de crecimiento transformante beta-quinasa 1 activada (TAK1) que resulta en la inhibición de la vía de NF- κ B ⁷⁷. *In vivo*, el papel regulador de Nur77 sobre la vía de NF- κ B se ha demostrado ampliamente y en distintos modelos de inflamación, ya que los ratones *NR4A1*^{-/-} son más susceptibles a la sepsis inducida por LPS y presentan un aumento de los niveles séricos de moléculas proinflamatorias como TNF, IL-6, IL-1 β con infiltrado de células proinflamatorias en el tejido pulmonar ^{74,81}. Además, el *NR4A1*^{-/-} tiene un aumento de la actividad de NF- κ B durante la colitis experimental en ratones con sulfato de sodio dextrano (DSS) y ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) ¹⁰⁸. Además, el tratamiento *in vitro* con Csn-B ha demostrado disminuir de forma dosis dependiente, la expresión del ARNm de moléculas inflamatorias como iNOS, COX2, IL1B, TNF, COX-2 en una línea celular de microglía BV2 (línea celular de ratón) estimuladas con LPS ¹⁰⁶. Sí bien todos los miembros de la familia NR4A son inducidos en respuesta a distintos estímulos inflamatorios ^{70,71} y se ha reportado que existen efectos compensatorios sobre las funciones que desempeñan cada uno de los receptores ¹⁰⁹⁻¹¹¹ (ya que todos han sido asociados como reguladores negativos de la inflamación y apoptosis de células T), dependiendo del sistema en que se estudien los receptores NR4A parecen expresarse e inducirse de manera diferencial, por ejemplo en microglía el estímulo con LPS induce la degradación de Nur77 ¹⁰⁶, en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) el LPS induce distintas cinéticas de expresión para cada uno de los NR4A a nivel de ARNm ¹⁰⁹, mientras que en nuestro sistema (datos aún o publicados) encontramos que NR4A2 (Nurr1) no incrementa su expresión (a nivel proteico) en respuesta a LPS ¹¹². Por lo que a pesar de llevar acabo funciones similares, la importancia de cada uno de los miembros sobre determinada función, parece ser dada por los factores intrínsecos del sistema donde se estudien estos receptores.

Debido a que se ha reportado utilizando un análisis GESA e IPA, que los macrófagos de los ratones *NR4A1*^{-/-} podrían estar involucrados en el desarrollo de inflamación crónica en procesos como osteoartritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis reumatoide, psoriasis y enfermedades inflamatorias alérgicas de las vías respiratorias ¹¹³, y porque por primera vez en macrófagos humanos nuestro grupo ha encontrado que la activación de Nur77 puede regular la respuesta inflamatoria en macrófagos pro y anti-inflamatorios, Nur77

puede emerger como una molécula para el tratamiento de los distintos procesos inflamatorios mencionados.

IX.-CONCLUSIONES

1. Los niveles proteicos de Nur77 se encuentran incrementados en los M ϕ -M con respecto a los M ϕ -GM, y correlacionan con los niveles de expresión de sus transcritos, lo que sugiere una fuerte asociación de este factor de transcripción con el fenotipo anti-inflamatorio.
2. Existe una diferencia importante en la estabilidad del ARNm, la vida media del ARNm de Nur77 en M ϕ -GM es de 45,7 min mientras que en los M ϕ -M es de 19.0 min
3. Nur77 es inducido a nivel de ARNm en respuesta a distintos PAMPs (LPS, Poli I:C y PGN) en ambas poblaciones de M ϕ , sin embargo, es más alto y rápidamente inducido en la población de M ϕ -M, lo que además de asociarlo con el perfil anti-inflamatorio, también sugiere que los factores, las vías, factores de transcripción y mecanismos postranscripcionales que favorecen la expresión de Nur77, se encuentran mayormente expresados en esta población.
4. El ARNm de Nur77 es inducido a través de las vías de NF- κ B y MAPKs (p38) en la población de M ϕ -M, mientras que en los M ϕ -GM es inducido principalmente por la vía de NF- κ B. Interesantemente, la MAPK JNK, inhibe la expresión del ARNm en la población de M ϕ -M, lo cual de momento no ha sido reportado y sugiere que existe un mecanismo de regulación negativo sobre su expresión y que es regulado por la activación de la MAPK JNK.
5. A pesar de la menor expresión de Nur77 en la población de M ϕ -GM, Nur77 al ser activado por su agonista (Csn-B) regula negativamente la secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β , lo que resulta interesante debido a los reportes que asocian este fenotipo de macrófagos con el desarrollo y mantenimiento de procesos inflamatorios crónicos.

X.-PERSPECTIVAS

1. Evaluar un número mayor de marcadores de polarización M1 y M2 activando Nur77 a lo largo de la diferenciación, con el fin de analizar si Nur77 es capaz de alterar la polarización de los M ϕ dictada por GM-CSF y M-CSF.
2. Identificar las moléculas (proteínas de unión a AREs) y las vías de señalización que favorecen la mayor estabilidad del ARNm de Nur77 en los M ϕ -GM.
3. Identificar posibles marcas epigenéticas sobre el promotor de Nur77 que pudieran favorecer su mayor expresión en la población de M ϕ -M.
4. Identificar los factores las vías, factores de transcripción y mecanismos postranscripcionales que favorecen la expresión de Nur77 en los M ϕ -M.
5. Evaluar posibles interacciones citoplasmáticas entre Nur77 y las subunidades de la familia de NF- κ B [RelA (p65), RelB, c-Rel, y p50] en presencia y ausencia de Csn-B tras el estímulo con LPS, además de evaluar la localización subcelular de estas proteínas.

XI.-BIBLIOGRAFÍA

1. Standiford, T., Kunkel, S., Basha, M., Chensue, S., Lynch, J., & Toews, G. 1990. *Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung.* Journal Of Clinical Investigation, 86(6), 1945-1953.
2. Ritchlin, C. 2000. *Fibroblast biology Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis.* Arthritis Research, 2(5), 356-360.
3. Verstrepen, L., Bekaert, T., Chau, T., Tavernier, J., Chariot, A., & Beyaert, R. 2008. *TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF- κ B: variations on a common theme.* Cellular And Molecular Life Sciences, 65(19), 2964-2978.
4. Wagner, E., & Eferl, R. 2005. *Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system.* Immunological Reviews, 208(1), 126-140.
5. Kondo, T., Kawai, T., & Akira, S. 2012. *Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling.* Trends In Immunology, 33(9), 449-458.
6. Wynn T, Chawla A, Pollard J. 2013. *Macrophage biology in development, homeostasis and disease.* Nature 496: 445–455.
7. Gordon S, Taylor P. 2005. *Monocyte and macrophage heterogeneity.* Nat. Rev. Immunol. 5: 953–965.
8. van Furth R, Cohn Z, Hirsch J, Humprey J, Spector W, Langevoort H. 1972. *The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells.* Bull. World Health Organ. 46: 845–852.
9. Ariel A, Maridonneau-Parini I, Rovere-Querini P, Levine J, Mühl H. 2012. *Macrophages in inflammation and its resolution.* Front. Immunol. 3: 1–2.
10. Schulz C, Gomez E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen S, Pollard J, Frampton J, Liu K, Greissmann F. 2012. *A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells.* Science 336: 86–90.
11. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Mehler M, Conway S, Ng L, Stanley E, Samokvalov I, Merad M. 2010. *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages.* Science 330: 841–845.
12. Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, Leboeuf M, Low D, Oller G, Almeida F, Choy S, Grisotto M, Reina L, Conway S, Stanley E, Chan J, Ng L, Samokhvalov I, Ginhoux F. 2012. *Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages.* J. Exp. Med. 209: 1167–1181.
13. Luke C Davies¹, Stephen J Jenkins², Judith E Allen³ & Philip R Taylor¹. 2013. *Tissue resident macrophages.* Nature immunology 14: 986 – 995.

14. Wang X, Cao Q, Yu L, Shi H, Xue B and Shi H. 2016. *Epigenetic regulation of macrophage polarization and inflammation by DNA methylation in obesity*. JCI Insight, 1(19): e87748.
15. Gordon, S. and P.R. Taylor, 2005. *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol. 5(12): 953-64.
16. D. M. Mosser and J. P. Edwards. 2014. *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat. Rev. Immunol. 8(12): 958–69.
17. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, Gonzalez-Espinoza L, Ucerro AC, Poveda J, Ruiz-Andres O, Ruiz-Ortega M, Selgas R, Egido J, Ortiz A. *et al.*, 2014. *Macrophages and recently identified forms of cell death*. Int. Rev. Immunol. 33 (1): 9–22.
18. Victor FC, Gottlieb AB 2002. *TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis*. J Drugs Dermatol. 1 (3): 264–75.
19. Lawrence T, Natoli G. 2011. *Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity*. Nat. Rev. Immunol. 11: 750–761.
20. Gosselin D, Link V, Romanoski C, Fonseca G, Eichenfield D, Spann N, Stender J, Chun H, Garner H, Geissmann F, Glass C. 2014. *Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities*. Cell 159: 1327–1340.
21. Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, Jung S, Amit I. 2014. *Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment*. Cell 159: 1312–1326.
22. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege J, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA., 2014. *Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guideline*. Immunity, vol. 41: 14–20.
23. J. L. Schultze, T. Freeman, D. A. Hume, and E. Latz, 2015. *A transcriptional perspective on human macrophage biology*. Semin. Immunol. 27: 44–50
24. T. R. Mosmann and R. L. Coffman. 1989. TH1 AND TH2 CELLS: *Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties*. Ann. Rev. Immunol. 7:145 73
25. F. O. Martinez and S. Gordon. 2014. *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000Prime Rep. 6: 13.
26. A. Sica and A. Mantovani. 2012. *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J. Clin. Invest. 122 (3): 787–795
27. F. O. Martinez, S. Gordon, M. Locati, and A. Mantovani, 2006. *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. J. Immunol. 177 (10): 7303–7311.

28. S. K. Biswas and A. Mantovani. 2010. *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets : cancer as a paradigm*. Nat. Immunol. 11 (10): 889–896.
29. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. 2004. *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol. 25: 677–686.
30. Mantovani A, Sica A, Locati M. 2005. *Macrophage polarization comes of age*. Immunity 23: 344–346.
31. Gordon S. 2003. *Alternative activation of macrophages*. Nat. Rev. Immunol. 3: 23–35.
32. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Utikal J, Goerdts S. 2005. *Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodeling and phagocytosis in type-2 macrophages*. J. Immunol. 174: 10–17.
33. Barreda D, Hanington P, Belosevic M. 2004. *Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors*. Dev. Comp. Immunol. 28: 509–554.
34. D A Young, L D Lowe and S C Clark. 1990. *Comparison of the effects of IL-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and macrophage colony-stimulating factor in supporting monocyte differentiation in culture. Analysis of macrophage antibody-dependent cellular cytotoxicity*. J Immunol 145 (2) 607-615.
35. Barreda D, Hanington P, Belosevic M. 2004. *Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors*. Dev. Comp. Immunol. 28: 509–554.
36. Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante A, Ahmed-Ansari A, Sell K, Pollard J, Stanley E. 1990. *Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse*. Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 87: 4828–4832.
37. Stanley E, Lieschke G, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall J, Maher D, Cebon J, Sinickas V, Dunn A. 1994. *Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology*. Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 91: 5592–5596.
38. Verreck F, De Boer T, Langenberg D, van der Zanden L, Ottenhoff T. 2006. *Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ and CD40L-mediated costimulation*. J. Leukoc. Biol. 79: 285–293.
39. Akagawa KS, Komuro I, Kanazawa H, Yamazaki T, Mochida K, Kishi F. 2006. *Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages*. Respirology. 11: S32-S36.
40. Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML. 2004. *Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco) bacteria*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 4560-4565.

41. González-Domínguez E, Samaniego R, Flores-Sevilla J, Campos-Campos S, Gómez-Campos G, Salas A, Campos-Peña V, Corbí AL, Sánchez-Mateos P, Sánchez-Torres C. 2015. *CD163L1 and CLEC5A discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo*. J. Leukoc. Biol. 98: 453–466.
42. Williams K, Kilm W. 2015. *Identification of in vivo markers for human polarized macrophages; a need that's finally met*. J. Leukoc. Biol. 98: 449–450.
43. Asoka Banno, Sowmya P. Lakshmi, Aravind T. Reddy, Seong C. Kim, and Raju C. Reddy. 2019. *Key Functions and Therapeutic Prospects of Nur77 in Inflammation Related Lung Diseases*. The American Journal of Pathology, 189(3).
44. Germain P, Staels B, Dacquet C, Speddig M, Laudet V. 2006. *Overview of nomenclature of nuclear receptors*. Pharmacol. Rev. 58: 685 - 704.
45. Milbrandt J. 1998. *Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene*. Neuron 1: 183-188.
46. Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW. 1992. *Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1*. Mol. Endocrinol. 6: 2129-2135.
47. Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K. 1996. *Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family*. Biochim. Biophys. Acta. 1308: 205-214.
48. Paulsen RE, Weaver CA, Fahrner TJ, Milbrandt J. 1992. *Domains regulating transcriptional activity of the inducible orphan receptor NGFI-B*. J. Biol. Chem. 267: 16491-16496.
49. Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. 2004. *Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily*. Nat. Rev. Drug Discov. 3: 950–964.
50. Moll UM, Marchenko N and Zhang X-k. 2006. *p53 and Nur77/TR3 – transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction*. Oncogene 25: 4725–4743.
51. Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J. 1991. *Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast*. Science 252: 1296-1300.
52. Wilson TE, Padgett KA, Johnston M, Milbrandt J. 1993. *A genetic method for defining DNA-binding domains: application to the nuclear receptor NGFI-B*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 90: 9186-9190.
53. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J. 1997. *Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells*. Mol. Cell. Biol. 17: 5946-5951.
54. Perlmann T, Jansson L. 1995. *A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1*. Genes Dev. 9: 769-782.
55. Zetterstrom RH, Solomin L, Mitsiadis T, Olson L, Perlmann T. 1996. *Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1*. Mol. Endocrinol. 10: 1656-1666.

56. Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH, Glass CK. 2009. *A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death*. *Cell* 137: 47-59.
57. Campos-Melo D, Galleguillos D, Sánchez N, Gysling K, and Andrés ME. 2013. *Nur transcription factors in stress and addiction*. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 6: 1-13.
58. Davis IJ, Hazel TG, Chen RH, Blenis J, Lau LF. 1993. *Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77*. *Mol. Endocrinol.* 7: 953-964.
59. Wingate AD, Campbell DG, Peggie M, Arthur JS. 2006. *Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation*. *Biochem. J.* 393: 715-724.
60. Han YH, Cao X, Lin B, Lin F, Kolluri SK, Stebbins J, Reed JC, Dawson MI, Zhang XK. 2006. *Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt*. *Oncogene* 25: 2974-2986.
61. Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E. 2002. *Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways*. *Mol. Endocrinol.* 16: 1638-1651.
62. Hirata Y, Kiuchi K, Chen HC, Milbrandt J, Guroff G. 1993. *The phosphorylation and DNA binding of the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B*. *J. Biol. Chem.* 268: 24808-24812.
63. Li Y, Lau LF. 1997. *Adrenocorticotrophic hormone regulates the activities of the orphan nuclear receptor Nur77 through modulation of phosphorylation*. *Endocrinology* 138: 4138-4146.
64. Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA. 1994. *Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77*. *Nature* 367: 281-284.
65. Shin-AeKang Hyelin NaHyun -Jin Kang Sung-Hye Kim Min-Ho Lee Mi-Ock Lee. 2010. *Regulation of Nur77 protein turnover through acetylation and deacetylation induced by p300 and HDAC1*. *Biochemical Pharmacology.* 80:6 867 – 873.
66. Pei L, Waki H, Vaitheesvaran B, Wilpitz DC, Kurland IJ, Tontonoz P. 2006. *NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism*. *Nat. Med.* 12: 1048-1055.
67. Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A. 1994. *Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas*. *Nature* 367: 277-281.
68. Martinez -González J., Badimon L. 2005. *The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells*. *Cardiovascular Research* (65) 609 – 618
69. Levi, M., Wang, X., & Choudhury, D. 2011. *Nuclear Hormone Receptors as Therapeutic Targets*. *Contributions To Nephrology*, 209-216.

70. Pei L, Castrillo A, Chen M, Hoffmann A, Tontonoz P. 2005. *Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli*. J. Biol. Chem. 280: 29256-29262.
71. Shao Q, Shen L, Hu L, Pu J, Qi M, Li W, Tian F, Jing Q, He B. 2010. *Nuclear receptor Nur77 suppresses inflammatory response dependent on COX-2 in macrophages induced by oxLDL*. J. Mol. Cell. Cardiol. 49: 304-311.
72. Pei L, Castrillo A, Tontonoz P. 2006. *Regulation of macrophage inflammatory gene expression by the orphan nuclear receptor Nur77*. Mol Endocrinol. 20: 786-794.
73. Li XM, Lu XX, Xu Q, Wang JR, Zhang S, Guo PD, Li JM, Wu H. 2015. *Nur77 deficiency leads to systemic inflammation in elderly mice*. J Inflamm 26: 12 - 40.
74. Li L, Liu Y, Chen H, Li F, Wu J, Zhang H, He J, Xing Y, Chen Y, Wang W, Tian X, Li A, Zhang Q, Huang P, Han J, Lin T, Wu Q. 2015. *Impeding the interaction between Nur77 and p38 reduces LPS-induced inflammation*. Nature Chemical Biology. 1788; 339 - 346.
75. Zhan Y., Du Xiping., Chen H., Liu J., Zhao B., Huang D., Li G., Xu Q., Zhang., Weimer B. C., Chen D., Cheng ., Zhang L., Li Q., Li S., Zheng Z., Song S., Huang Y., Ye Z., Su W., Lin S., Shen Y., Wu. 2008. *Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77*. Nat. Chem. Biol. 4: 548–556.
76. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt, JA, Geissmann F, Hedrick CC. 2012. *“The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and survival of Ly6C- monocytes”*. Nat Immunol. 8: 778–785.
77. Wu H, Li XM, Wang JR, Gan WJ, Jiang FQ, Liu Y, Zhang XD, He XS, Zhao YY, Lu XX, Guo YB, Zhang XK, Li JM. 2016. *“NUR77 exerts a protective effect against inflammatory bowel disease by negatively regulating the TRAF6/TLR–IL-1R signaling axis”*. J Pathol. 238(3):457 - 69.
78. Sánchez-Torres C, García-Romo GS, Cornejo-Cortés M, Rivas-Carvalho A, Sánchez-Schmitz G. 2001. *CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells*. Int. Immunol. 13: 1571-1581.
79. Schott J, Reitter S, Philipp J, Haneke K, Schäfer H, Stoecklin G. 2014. *Translational regulation of specific mRNAs controls feedback inhibition and survival during macrophage activation*. PLoS Genet. 19;10(6):e1004368.
80. 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. 2006. *Nuclear receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid and inflammatory responses*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26: 2288-2294.
81. Li XM, Zhang S, He XS, Guo PD, Lu XX, Wang JR, Li JM, Wu H. 2016. *Nur77-mediated TRAF6 signalling protects against LPS-induced sepsis in mice*. J Inflamm (Lond). 2;13:4.

82. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. 2007 *Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior*. Science. 317:666–670
83. Hanna RN, Shaked I, Hubbeling HG, Punt JA, Wu R, Herrley E, Zaugg C, Pei H, Geissmann F, Ley K, Hedrick CC. 2012. *NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis*. Circ. Res. 110: 416-427.
84. Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, Herrley E, Rasquinha N, McArdle S, Wu R, Peluso E, Metzger D, Ichinose H, Shaked I, Chodaczek G, Biswas SK, Hedrick CC. 2015. *Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung*. Science. 20;350(6263):985-990.
85. Daniel Crean, Eoin P. Cummins, Bojlul Bahar, Helen Mohan, Jason P. McMorrow and Evelyn P. Murphy. 2015. *Adenosine Modulates NR4A Orphan Nuclear Receptors To Attenuate Hyperinflammatory Responses in Monocytic Cells*. J Immunol. 195 (4) 1436-1448.
86. Diatchenko L, Romanov S, Malinina I, Clarke J, Tchivilev I, Li X, Makarov SS. 2005. *Identification of novel mediators of NF-kappaB through genome-wide survey of monocyte adherence-induced genes*. J Leukoc Biol. 78(6):1366-77
87. Xina Xie, Xuhong Song, Song Yuan, Haitao Cai, Yequn Chen, Xiaolan Chang, Bin Liang and Dongyang Huang. 2015. *Histone acetylation regulates orphan nuclear receptor NR4A1 expression in hypercholesterolaemia*. Clinical Science. 129, 1151–1161.
88. Dezheng Zhao, Liuliang Qin, Pierre-Marie Bourbon, Lauralee James, Harold F. Dvorak, and Huiyan Zeng. 2011. *Orphan nuclear transcription factor TR3/Nur77 regulates microvessel permeability by targeting endothelial nitric oxide synthase and destabilizing endothelial junctions*. PNAS 108 (29) 12066 – 12071.
89. de las Casas-Engel M, Domínguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Bragado R, Nieto C, Puig-Kroger A, Samaniego R, Loza M, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Bustos M, Sánchez-Mateos P, Corbí AL. 2013. *Serotonin skews human macrophage polarization through HTR2B and HTR7*. J Immunol. 190(5):2301-2310.
90. Li XM, Wang JR, Shen T, Gao SS, He XS, Li JN, Yang TY, Zhang S, Gan WJ, Li JM, Wu H. 2017. *Nur77 deficiency in mice accelerates tumor invasion and metastasis by facilitating TNF α secretion and lowering CSF-1R expression*. PLoS One. 12(2):e0171347.
91. Arvind Raghavan, Rachel L. Ogilvie, Cavan Reilly, Michelle L. Abelson, Shalini Raghavan, Jayprakash Vasdewani, Mitchell Krathwohl and Paul R. Bohjanen. 2002.

- Genome-wide analysis of mRNA decay in resting and activated primary human T lymphocytes.* Nucleic Acids Res. 15;30(24):5529-38.
- 92.Chen CY, Shyu AB. 1994. *Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements.* Mol Cell Biol. 14(12):8471-8482.
- 93.Chen,C.Y., Gherzi,R., Ong,S.E., Chan,E.L., Raijmakers,R., Pruijn,G.J., Stoecklin,G., Moroni,C., Mann,M. and Karin,M. 2001. *AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs.* Cell, 107, 451-464.
- 94.Luis Alberto Pereira, Roberto Munita, Marcela Paz González, María Estela Andrés. 2017. *Long 3'UTR of Nurr1 mRNAs is targeted by miRNAs in mesencephalic dopamine neurons.* PLoS One. 12(11): e0188177.
- 95.Xina Xie, Jiatian Lin, Jianlan Liu, Meihui Huang, Yuantang Zhong, Bin Liang, Xuhong Song, Songgang Gu, Xiaolan Chang, Dongyang Huang, Aifa Tang. 2019. *A novel lncRNA NR4A1AS up-regulates orphan nuclear receptor NR4A1 expression by blocking UPF1-mediated mRNA destabilization in colorectal cancer.* Clin Sci (Lond). 15;133(13):1457-1473.
- 96.Carlos O. Stocco, Lester F. Lau, and Geula Gibori. 2002. *A Calcium/Calmodulin-dependent Activation of ERK1/2 Mediates JunD Phosphorylation and Induction of nur77 and 20-hsd Genes by Prostaglandin F2 in Ovarian Cells.* The Journal of biological chemistry. 277, 5 3293–3302.
- 97.Bahrami S, Drabløs F. 2016. *Gene regulation in the immediate-early response process.* Adv Biol Regul. 62:37-49.
- 98.Erik Schilling, Ronald Weiss, Anja Grahnert, Michael Bitar, Ulrich Sack, Sunna Hauschildt. 2018. *Molecular mechanism of LPS-induced TNF- α biosynthesis in polarized human macrophages.* Molecular Immunology 93 (206–215).
- 99.Víctor Delgado Cuevas. 2016. *Transcriptional profile of human anti-inflammatory macrophages under homeostatic, activating and pathological conditions* Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas.
- 100.Rajpal A, Cho YA, Yelent B, Koza-Taylor PH, Li D, Chen E, Whang M, Kang C, Turi TG, Winoto A. 2003. *Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor.* EMBO J. 22:6526-6536.
- 101.Han YH, Cao X, Lin B, Lin F, Kolluri SK, Stebbins J, Reed JC, Dawson MI, Zhang XK. 2006. *Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt.* Oncogene. 18;25(21):2974-86.
- 102.Liu B, Wu JF, Zhan YY, Chen HZ, Zhang XY, Wu Q. 2007. *Regulation of the orphan receptor TR3 nuclear functions by c-Jun N terminal kinase phosphorylation.* Endocrinology.148(1):34-44.
- 103.Reiko Sugiura, Ryosuke Satoh, Shunji Ishiwata, Nanae Umeda, and Ayako Kita. 2011. *Role of RNA-Binding Proteins in MAPK Signal Transduction Pathway.* J Signal Transduct. 2011: 109746.

104. Hu Y., Zhang P., Yang J., Huang J., Ma X., Li S., Zhao J., Hu Y., Wang Y., Gao J., Sha Y., Zheng L., Wang Q. 2014. *Nur77 decreases Atherosclerosis Progression in ApoE^{-/-} Mice Fed a High-Fat/High-Cholesterol Diet*. Plos one. 9:1, 1 – 12
105. Egarnes B, Blanchet MR, Gosselin J. 2017. *Treatment with the NR4A1 agonist cytosporone B controls influenza virus infection and improves pulmonary function in infected mice*. PLoS One. 20;12(10):e0186639.
106. Liu TY, Yang XY, Zheng LT, Wang GH, Zhen XC. 2017. *Activation of Nur77 in microglia attenuates proinflammatory mediators production and protects dopaminergic neurons from inflammation-induced cell death*. J Neurochem 140(4):589-604
107. Kurakula K, Koenis DS, M. van Tiel C, J.M. de Vries C. 2014. *NR4A nuclear receptors are orphans but not lonesome*. Biochimica et Biophysica Acta. 1843: 2543–2555.
108. Hamers AA, van Dam L, Teixeira Duarte JM, Vos M, Marinković G, van Tiel CM, Meijer SL, van Stalborch AM, Huveneers S, Te Velde AA, de Jonge WJ, de Vries CJ. 2015. *Deficiency of Nuclear Receptor Nur77 Aggravates Mouse Experimental Colitis by Increased NFκB Activity in Macrophages*. PLoS One. 4:10.
109. McEvoy C, de Gaetano M, Giffney HE, Bahar B, Cummins EP, Brennan EP, Barry M, Belton O, Godson CG, Murphy EP, Crean D. 2017. *NR4A Receptors Differentially Regulate NF-κB Signaling in Myeloid Cells*. Front Immunol. 23;8:7.
110. Popichak KA, Hammond SL, Moreno JA, Afzali MF, Backos DS, Slayden RD, Safe S, Tjalkens RB. 2018. *Compensatory Expression of Nur77 and Nurr1 Regulates NF-κB-Dependent Inflammatory Signaling in Astrocytes*. Mol Pharmacol 94(4):1174-1186.
111. Sekiya T, Kashiwagi I, Yoshida R, Fukaya T, Morita R, Kimura A, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Yoshimura A. 2013. *Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis*. Nat Immunol. 14(3):230-7
112. Barbosa Solís M. 2019. *Evaluación de la regulación de la expresión y de la actividad del receptor nuclear Nurr1 en los macrófagos humanos polarizados*. Tesis de Maestría. CINVESTAV.
113. Hamers AA, Argmann C, Moerland PD, Koenis DS, Marinković G, Sokolović M, de Vos AF, de Vries CJ, van Tiel CM. 2016. *Nur77-deficiency in bone marrow-derived macrophages modulates inflammatory responses, extracellular matrix homeostasis, phagocytosis and tolerance*. BMC Genomics. 1;17:162.