

**Cinvestav**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Zacatenco

Departamento de Biomedicina Molecular

**“Evaluación de la regulación de la expresión y de la  
actividad del receptor nuclear Nurr1 en los  
macrófagos humanos polarizados”**

Tesis que presenta:

**Miguel Ángel Solís Barbosa**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

**en la Especialidad de Biomedicina Molecular**

Directora de tesis:

**Dra. María Carmen Sánchez Torres**

Ciudad de México

Agosto 2019

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

### COMITÉ TUTORIAL

Directora de tesis:

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Asesores:

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Departamento de biomedicina Molecular, CINVESTAV

El Q.F.B. Miguel Ángel Solís Barbosa realizó esta tesis de maestría con una beca otorgada por CONACYT (No.631361)

---

## AGRADECIMIENTOS

- Al CONACYT por el apoyo económico facilitado a través de la beca No. 631361 para el desarrollo de estudios de maestría.
  - Al CINVESTAV por permitirme formar parte de esta magnífica institución y realizar mis estudios de maestría.
  - A los Bancos de sangre del centro Médico Nacional “La Raza”, Hospital Ticomán y el Centro Nacional de la Transfusión por las facilidades para la adquisición de las muestras utilizadas en el desarrollo de este trabajo.
  - A la Dra. María Carmen Sánchez Torres por ser parte fundamental en esta etapa de mi formación, con sus enseñanzas, consejos y paciencia.
  - A mis asesores: Dr. Leopoldo Santos Argumedo y Dr. Marco Antonio Meraz Ríos por todas las observaciones y sugerencias compartidas para mejorar este proyecto.
  - A la Dra. Norma Segovia por sus consejos y ayuda en la realización de las técnicas de laboratorio.
  - A María de Jesús Maqueda, Ninfa Arreola y Julio Ramírez por su apoyo y excelente trabajo.
  - A mi familia, mis padres Gloria Barbosa Sabanero y Miguel Ángel Solís Martínez, y a mi hermana Fernanda, gracias por todo su apoyo, pero sobre todo por su cariño.
  - A Mayte por su amistad y apoyo incondicional, sobre todo en los momentos difíciles, tanto en lo académico como en lo personal.
  - A mis compañeros de laboratorio, Pepito, Lalo y Ramón por hacer tan agradable el ambiente en el laboratorio, por toda su ayuda, consejos, risas y buenos momentos que pasamos juntos.
  - A mis compañeros de generación por su amistad y apoyo durante los cursos de maestría.
  - A los Doctores y compañeros del Departamento de Biomedicina Molecular por las facilidades y disponibilidad del uso de los equipos pertenecientes a sus laboratorios.
-

---

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ABREVIATURAS .....	2
RESUMEN EN ESPAÑOL.....	6
RESUMEN EN INGLÉS.....	7
I. INTRODUCCIÓN .....	8
1.1. La respuesta inflamatoria y su señalización.....	8
1.2. Receptores Nucleares como blanco terapéutico.....	9
1.3. El receptor nuclear Nurr1 .....	9
1.4. Nurr1 en la respuesta inflamatoria.....	14
1.5. Expresión de Nurr1 en patologías inflamatorias.....	15
Artritis Reumatoide .....	15
Cancer Colorrectal.....	16
Psoriasis .....	16
Esclerosis Múltiple.....	17
Enfermedad de Parkinson.....	17
Aterosclerosis .....	17
1.6. Efectos pro- y anti-inflamatorios de Nurr1 .....	18
1.7. Los macrófagos como células clave del proceso inflamatorio .....	18
II. ANTECEDENTES DIRECTOS .....	20
2.1. Expresión de los receptores NR4A en los Mφ humanos .....	20

---

---

III.	JUSTIFICACIÓN .....	22
IV.	HIPÓTESIS .....	22
V.	OBJETIVO GENERAL .....	23
VI.	OBJETIVOS PARTICULARES .....	23
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
	7.1 Aislamiento de monocitos .....	24
	7.2. Generación de GM-M $\phi$ y M-M $\phi$ .....	24
	7.3. Ensayos de Western blot .....	25
	7.4. Extracción de RNA.....	25
	7.5. Análisis de expresión de transcritos por PCR cuantitativa.....	26
	7.6. Inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B en GM-M $\phi$ y M-M $\phi$ .....	26
	7.7. Silenciamiento de Nurr1 .....	27
	7.8. Activación de Nurr1 con su agonista C-DIM12 durante la diferenciación de los macrófagos .....	28
	7.9. Análisis estadístico.....	28
VIII.	RESULTADOS .....	29
	8.1. Expresión basal de Nurr1 en M $\phi$ pro- (GM-M $\phi$ ) y anti-inflamatorios (M-M $\phi$ ) .....	29
	8.2. Cinética de expresión de <i>NR4A2</i> en respuesta a distintos PAMPs .....	30
	8.3. La inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B disminuye la expresión de <i>NR4A2</i> .....	31
	8.4. Generación de M $\phi$ deficientes en la expresión de Nurr1 .....	32
	8.5. Nurr1 es un regulador negativo de la función inflamatoria de los GM-M $\phi$ .....	34

---

---

8.6. La activación de Nurr1 durante el proceso de diferenciación no modifica de manera global la polarización de los M $\phi$ .....	35
8.7. Comparación de los genes regulados tras la inducción o supresión de la actividad de Nurr1 .....	37
8.8. La activación de Nurr1 durante el proceso de diferenciación atenúa la capacidad inflamatoria de los M $\phi$ humanos en respuesta a LPS .....	38
IX. DISCUSIÓN .....	40
X. CONCLUSIONES.....	46
XI. PERSPECTIVAS.....	47
XII. BIBLIOGRAFÍA .....	48

---

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1 Biología molecular de los receptores nucleares huérfanos NR4A.....	11
Figura 2 Nurr1 regula la actividad de NF- $\kappa$ B para limitar la respuesta inflamatoria. ....	12
Figura 3 Vías de señalización involucradas en la regulación de los receptores nucleares huérfanos NR4A y procesos celulares en los que estos receptores se ven involucrados.....	14
Figura 4 Expresión de los receptores NR4A en los M $\phi$ humanos polarizados.. ....	20
Figura 5 Expresión de Nurr1 en los M $\phi$ humanos polarizados.. ....	21
Figura 6 Expresión basal del mRNA y de la proteína de Nurr1 en M $\phi$ pro- y anti-inflamatorios.. ....	29
Figura 7 Cinética de expresión de NR4A2 en respuesta a distintos PAMPs.....	31
Figura 8 Expresión de NR4A2 tras la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B.....	32
Figura 9 Expresión de la proteína y el mRNA de Nurr1 tras el silenciamiento.. ....	33
Figura 10 Marcadores de la polarización en GM-M $\phi$ transfectados con el siNurr1.. ....	34
Figura 11 Marcadores de la polarización en M-M $\phi$ transfectados con el siNurr1.....	35
Figura 12 Marcadores de la polarización tras la activación de Nurr1 con su agonista C-DIM12 durante el proceso de diferenciación.....	36
Figura 13 Posibles genes blanco de Nurr1.. ....	37
Figura 14 Secreción de citocinas en M $\phi$ pro- (GM-M $\phi$ ) y anti-inflamatorios (M-M $\phi$ ) tras la activación con el agonista de Nurr1 C-DIM12 durante el proceso de diferenciación.. ....	38

---

**ABREVIATURAS**

Ab: anticuerpo

AF: factor activador

AP: proteína activadora

ARE: AU-rich elements

BSA: albumina de suero bovino

cDNA: DNA complementario

ChiP: inmunoprecipitación de la cromatina

CIL: células linfoides inhatas

COX: ciclooxigenasa

CREB: cAMP response element binding

CRH: hormona liberadora de corticotropina

CsnB: cytosporon B

DBD: dominio de unión a DNA

DEPC: dietilpirocarbonato

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

EGF: factor de crecimiento epidérmico

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FGF: factor de crecimiento fibroblástico

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

---



GM- M $\phi$ : macrófagos generados con GM-CSF

GSK3: glycogen synthase kinase-3

IBD: enfermedades inflamatorias intestinales

IFN: interferón

I $\kappa$ B: inhibidor de  $\kappa$ B

IL: interleucina

IL-1Ra: antagonista del receptor de interleucina 1

iNos: sintasa inducible de óxido nítrico

IRF: factores reguladores de interferón

LBD: dominio de unión a ligando

LPS: lipopolisacárido bacteriano

MACS: Magnetic Cell Sorting

MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos

MCP: proteína quimioatrayente de monocitos

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos

M $\phi$ : macrófago

M-M $\phi$ : macrófagos generados con M-CSF

MMP: metaloproteasas de matriz

mRNA: RNA mensajero

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

---

NF- $\kappa$ B: factor nuclear  $\kappa$ B

NK: Natural Killer

NLK: nemo like kinase

NR: receptores nucleares

NOS: sintasa de óxido nítrico

NurRE: elemento de respuesta a Nurr

PAMP: patrón molecular asociado a patógenos

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

PBS: Buffer salino de fosfatos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGE: prostaglandina E

PGN: peptidoglicano

Pias4: protein inhibitor of activated STAT4

PI3K: fosfatidil inositol 3 cinasa

PK: proteína cinasa

Poly (I:C): ácido poliinosínico-policitidílico

POMC: proopiomelanocortina

Ps: psoriasis

PsA Artritis psoriásica

---

PVDF: polyvinylidene difluoride

q-PCR: PCR cuantitativa

RA: artritis reumatoide

RNA: ácido ribonucleico

ROS: especies reactivas de oxígeno

RXR: receptor X retinoide

SFB: suero fetal bovino

siRNA: RNA pequeño de interferencia

SR: receptor scavenger

TBP: TATA-box binding protein

TBS-T Tris Buffered Saline with Tween

TF: factor de transcripción

TGF: factor de crecimiento transformante

Th: T-helper

TIMP: inhibidor tisular de metaloproteinasas

TLR: receptor tipo Toll

TNF: factor de necrosis tumoral

UNG: Uracil N-glicosilasa

VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular

---

---

## RESUMEN EN ESPAÑOL

Nurr1 pertenece a la subfamilia de receptores nucleares NR4A. Se ha demostrado la expresión del receptor nuclear Nurr1 en muestras de tejido asociado a diversas patologías inflamatorias, en donde Nurr1 participa como factor de transcripción (TF) activando o reprimiendo la respuesta inflamatoria. Los macrófagos (M $\phi$ ) son células clave en la regulación de la respuesta inflamatoria y pueden polarizarse hacia fenotipos pro- y anti-inflamatorios. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha encontrado que la expresión de la proteína Nurr1 está incrementada en M $\phi$  pro-inflamatorios humanos generados a partir de monocitos con el factor estimulante de colonias de granulocitos/M $\phi$  (GM-M $\phi$ ) con respecto a los M $\phi$  anti-inflamatorios generados por el factor estimulante de colonias de M $\phi$  (M-M $\phi$ ). Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la regulación de la expresión y de la actividad del receptor nuclear Nurr1 en los M $\phi$  humanos polarizados. Se encontró que la expresión de *NR4A2*, el gen que codifica Nurr1, fue similar en ambas poblaciones de M $\phi$ , lo que sugiere una regulación postranscripcional distinta entre los M-M $\phi$  y los GM-M $\phi$ . La expresión de *NR4A2* se indujo en respuesta a distintos PAMPs, como LPS, PGN y poly (I:C). Los picos de inducción fueron más tempranos en los M-M $\phi$ , sugiriendo una mayor expresión de los TFs necesarios para la síntesis de Nurr1 o una mayor accesibilidad del promotor de Nurr1 a estos TFs en estos M $\phi$ . La inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B disminuyó los niveles de expresión de *NR4A2* en respuesta a LPS, aunque no por completo, lo cual indica la participación de otras vías de señalización en la regulación de este gen en los M $\phi$  humanos polarizados. El silenciamiento de Nurr1 mostró una inducción de la expresión génica de marcadores asociados a la polarización M1 y una inhibición de los genes marcadores de la polarización M2 en los GM-M $\phi$ . Además, la secreción de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-6 en respuesta a LPS disminuyó de manera importante en los GM-M $\phi$  tras la activación de Nurr1 durante su diferenciación. En conclusión, Nurr1 podría estar funcionando como un regulador negativo de la función inflamatoria de los macrófagos humanos, específicamente de los M $\phi$  polarizados M1.

---

---

## RESUMEN EN INGLÉS

Nurr1 belongs to the subfamily of nuclear receptors NR4A. Its expression has been demonstrated in tissue samples associated with various inflammatory pathologies, where Nurr1 participates as a transcription factor (TF) activating or repressing the inflammatory response. Macrophages (M $\phi$ ) are key cells in the regulation of the inflammatory response and can be polarized towards pro- (M1) and anti-inflammatory (M2) phenotypes. In this context, our research group has found that the expression of Nurr1 is increased in human pro-inflammatory M $\phi$  generated from monocytes cultured with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor/M $\phi$  (GM-M $\phi$ ) with respect to the anti-inflammatory M $\phi$  generated with macrophage colony-stimulating factor (M-M $\phi$ ). Therefore, the objective of the present work was to evaluate the regulation of the expression and activity of the nuclear receptor Nurr1 in polarized human M $\phi$ . We found that the expression of *NR4A2*, the gene encoding Nurr1, was similar in M-M $\phi$  and GM-M $\phi$ , which suggests a different post-transcriptional regulation between the two M $\phi$  populations. The expression of *NR4A2* was induced in response to several PAMPs such as LPS, PGN and poly (I: C). The peak of *NR4A2* induction was earlier in M-M $\phi$ , suggesting a higher amount of the TFs needed for *NR4A2* synthesis, or greater accessibility of the Nurr1 promoter to these TFs, in these M $\phi$ . The inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway decreased the expression levels of *NR4A2* upon stimulation with LPS, though not completely, suggesting the involvement of other signaling pathways in the regulation of *NR4A2* expression in polarized human M $\phi$ . RNA-mediated *NR4A2* silencing showed an induction of M1-associated gene markers and an inhibition of M2-related markers in GM-M $\phi$ . Additionally, the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6 substantially decreased in GM-M $\phi$  exposed to LPS when Nurr1 was activated during their differentiation process. In conclusion, our data suggest that Nurr1 negatively regulates the inflammatory function of human M $\phi$ , specifically of M1 M $\phi$ .

---

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La respuesta inflamatoria y su señalización

La inflamación es una respuesta biológica a la infección, daño tisular, y desórdenes autoinmunes, y es un mecanismo beneficioso 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 ( $M\phi$ ), células linfoides innatas, células NK, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales y células madre, y que juntas constituyen la respuesta celular que orquesta la reparación de tejidos. A nivel molecular se caracteriza por la activación de varias vías de señalización: los factores nucleares (NF)- $\kappa$ B, las proteínas activadoras (AP)-1, los factores reguladores de interferón (IRF), la fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3K), y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Su activación conlleva la liberación de factores 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 amplifica genes que controlan y terminan la inflamación para asegurar la reparación del tejido y la restauración de la homeostasis (5). Mientras que la inflamación aguda se considera un mecanismo beneficioso que devuelve al tejido a la homeostasis, la inflamación prolongada se asocia con trastornos de enfermedades crónicas. Las enfermedades inflamatorias representan uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. Entre ellas se incluyen un amplio rango de condiciones patológicas, como la artritis reumatoide (RA), las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD), cáncer, o enfermedades cardiovasculares y metabólicas.

---

---

## 1.2. Receptores Nucleares como blanco terapéutico

La superfamilia de los receptores nucleares (NR) está compuesta por 48 factores de transcripción (TF) en humanos y comprende receptores intracelulares que regulan una gran variedad de funciones fisiológicas (6). Las acciones de los NR están moduladas por varios mecanismos endógenos que incluyen: 1) unión al ligando, 2) modificación postraduccional, 3) dimerización de proteínas, 4) transferencia nuclear, 5) interacciones proteína-proteína con activadores y represores 6) unión cooperativa de DNA con otros factores de transcripción (7, 8). De acuerdo a su similitud de secuencia, los NR se subdividen en 7 subfamilias: 1) receptores de hormona tiroidea, 2) receptores de retinoide X, 3) receptores esteroideos, 4) factores de crecimiento nervioso tipo IB, 5) factores esteroideogénicos, 6) factor nuclear de células germinales, 7) varios (DAX1 y SHP) (9). La presencia de sitios de unión a ligando distintivos ha hecho de los NR objetivos atractivos para el desarrollo de terapias farmacológicas (10). Existe un subgrupo de NR denominados “huérfanos” para los cuales no se han descrito ligandos endógenos. Entre los NR huérfanos, la familia de receptores NR4A ha sido asociada recientemente con varios aspectos de los procesos inflamatorios, por lo que constituyen un área de investigación activa para el desarrollo de estrategias terapéuticas contra un amplio rango de enfermedades inflamatorias, como RA, IBD, síndrome metabólico, cáncer, o aterosclerosis (6). La modulación de la actividad de los NR4A ha demostrado ser beneficiosa en modelos animales de diabetes (11) y de aterosclerosis (12).

## 1.3. El receptor nuclear Nurr1

Nurr1 forma parte de la familia de receptores nucleares NR4A, que está compuesta por tres miembros: Nur77 (NR4A1), Nurr1 (NR4A2) y NOR-1 (NR4A3) (13-16). Los tres se expresan predominantemente en tejidos como músculo esquelético, hígado y tejido adiposo, así como en células del sistema nervioso, músculo liso y endotelios vasculares (17). También se ha demostrado su expresión en células del sistema

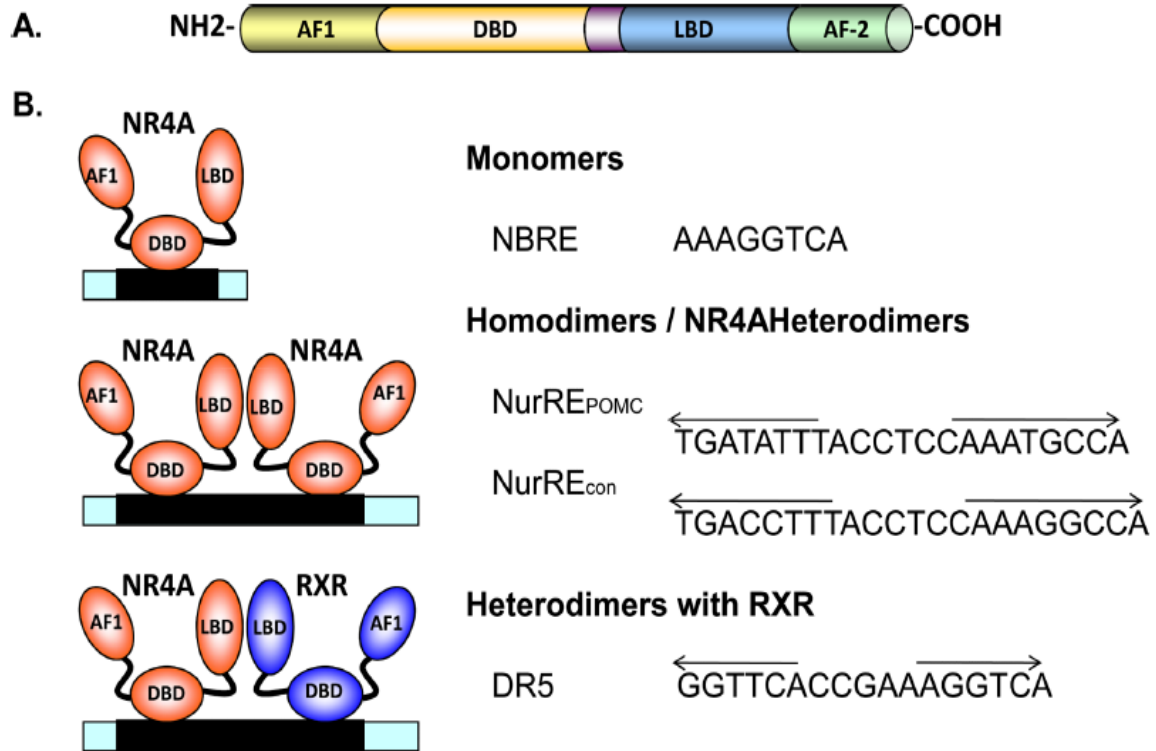
---

inmunitario, y han sido especialmente estudiados en los M $\phi$ , células dendríticas y linfocitos T (18-21).

Los receptores NR4A presentan un dominio de transactivación independiente de ligando en la región N-terminal (AF-1), un dominio central de unión a DNA (DBD) altamente conservado formado por dos dedos de zinc y un dominio de unión a ligando (LBD) que a su vez contiene un dominio de transactivación dependiente de ligando en su extremo C-terminal (AF-2) (Fig. 1A) (22). El LBD tiene una estructura atípica y hasta el momento no se han descrito ligandos endógenos, por lo que se les ha llamado receptores nucleares huérfanos y se considera que estos NR están constitutivamente activos y que actúan independientemente de ligando. No obstante, se han descrito algunas moléculas que pueden unirse al LBD y actuar como agonistas o antagonistas de los NR4A, como el fármaco anti-neoplásico 6-mercaptopurina o el octaquétido cytosporone B (CsnB) (23). Estos TF pueden activar la transcripción de sus genes blanco en forma monomérica, homodimérica y heterodimérica. Como heterodímeros pueden formar complejos con otros TF de su misma familia o con otros receptores nucleares. Los monómeros se unen a los elementos de respuesta NBRE (AAAGGTCA), mientras que los homodímeros y los heterodímeros formados entre los miembros de la familia NR4A se unen al elemento de respuesta a Nurr (NurRE, TGATATTTn6AAATGCCA) (24, 25). Además, Nur77 y Nurr1 pueden formar heterodímeros con el receptor X retinoide (RXR) y activar la transcripción a través del elemento de respuesta DR-5 (Fig. 1B) (26).

---

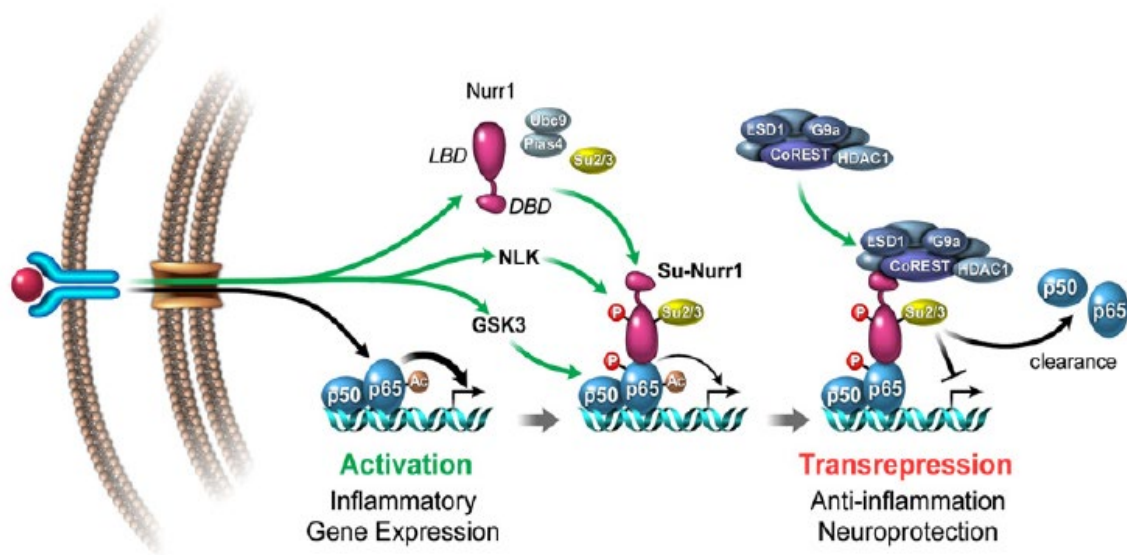




**Figura 1. Estructura de los receptores nucleares huérfanos NR4A.** (A) Los receptores NR4A comparten una estructura molecular conservada que consta de un dominio de transactivación N-terminal AF-1, un dominio central de unión a DNA (DBD), un dominio de unión a ligando (LBD) y un dominio de transactivación C-terminal AF-2. (B) Los receptores NR4A inducen la expresión génica al unirse como monómeros al sitio NBRE y como homodímeros o heterodímeros al sitio NurRE en el promotor de sus genes blanco. NurRE<sub>POMC</sub> representa la secuencia de unión demostrada en el promotor pro-opiomelanocortina (POMC), mientras que NurRE<sub>con</sub> representa el sitio NurRE que comprende sitios NBRE consenso. Nur77 y Nurr1, pero no NOR1, heterodimerizan con RXR y se unen a las repeticiones directas del motivo de unión al receptor nuclear separados por cinco nucleótidos (DR5) (22).

Inicialmente los receptores NR4A fueron descritos como activadores de la transcripción pero estudios recientes han demostrado que también pueden reprimir la transcripción génica a través de su unión a moléculas co-activadoras con actividad de acetiltransferasa de histonas (SRC-1 y -2, p300), o bien a complejos co-represores con actividad de desacetilasa y demetilasa de histonas (ej: LSD1, SMRT, CoREST, HDAC1) (27, 28). Además, los NR4A pueden regular la expresión génica a través de

mecanismos de “transrepresión”, interfiriendo con varias vías de señalización. Particularmente Nurr1 se ha reportado que puede reprimir la transcripción de genes inflamatorios en microglía y astrocitos, mediante la unión a NF- $\kappa$ B/p65 en la región promotora de sus genes blanco y el posterior reclutamiento del complejo corepresor CoREST, resultando en la liberación de NF- $\kappa$ B/p65 de la región promotora y reprimiendo la transcripción (29) (Fig. 2).



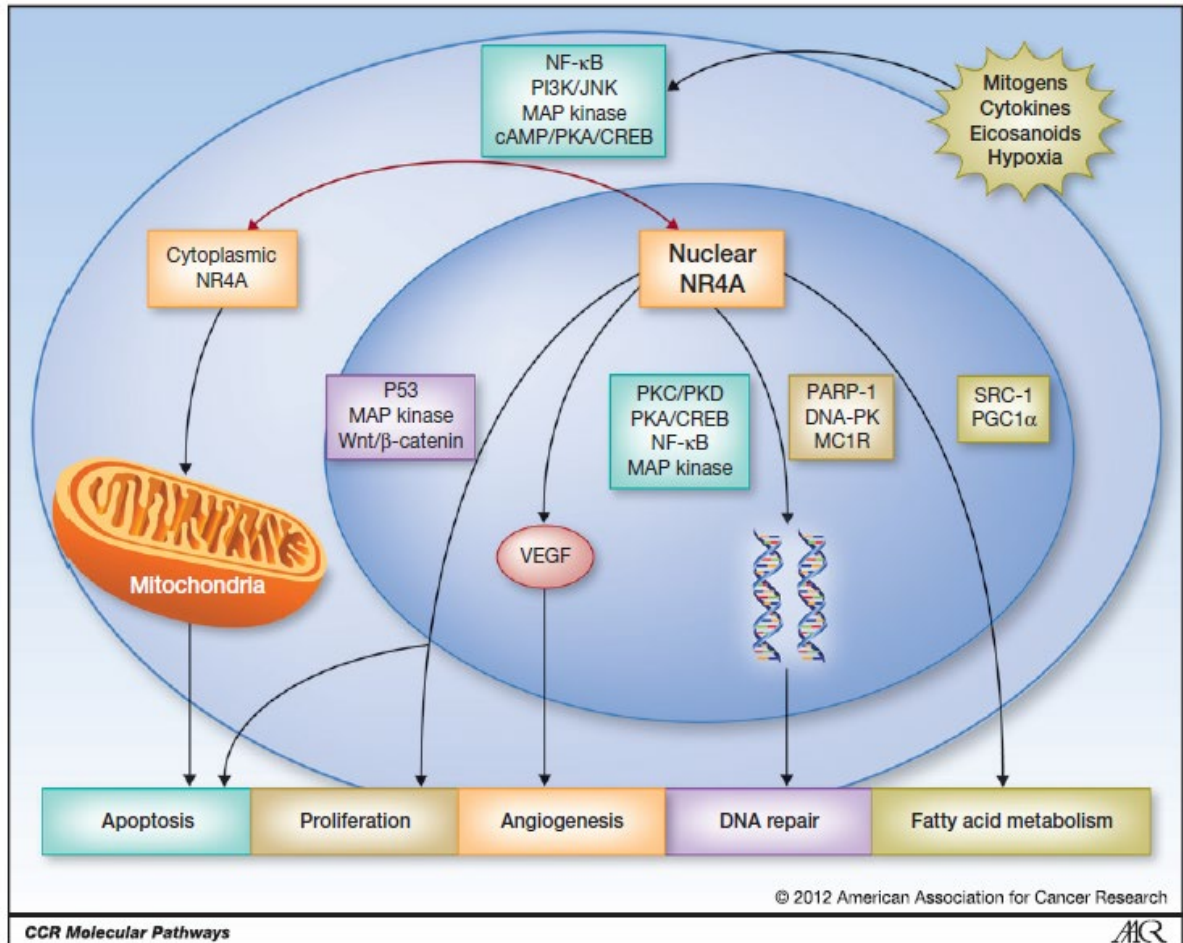
**Figura 2. Nurr1 regula la actividad de NF- $\kappa$ B para limitar la respuesta inflamatoria.** Diagrama que muestra el mecanismo molecular por el cual Nurr1 regula la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B río abajo de la activación del receptor TLR4. Nurr1 limita la respuesta inflamatoria alterando la regulación de la expresión génica de citocinas y quimiocinas dependiente de NF- $\kappa$ B. Durante la inflamación Nurr1 es SUMOilado por la proteína inhibidora de STAT4 activado (Pias4, protein inhibitor of activated STAT4) y fosforilado por una cinasa tipo NEMO (NLK, nemo-like kinase). Nurr1 puede unirse a NF- $\kappa$ B/p65 fosforilado por la cinasa-3 de la glucógeno sintasa (GSK3, glycogen synthase kinase-3) en la región promotora de sus genes blanco. Nurr1 recluta un complejo represor conocido como CoREST. La asociación de este complejo represor promueve la liberación de NF- $\kappa$ B/p65 del promotor de sus genes blanco, tales como TNF $\alpha$ , y la subsecuente inhibición de la respuesta inflamatoria (29).

La actividad de los receptores NR4A se ha asociado con diversos procesos fisiológicos como la inflamación, el metabolismo de lípidos y carbohidratos, así como con la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (30). Sin embargo, su actividad es

compleja, y parece depender del contexto celular evaluado. Así, Nur77 induce apoptosis e inhibe el crecimiento celular en algunos tipos de cáncer, timocitos y células de músculo liso, y actúa como un factor anti-apoptótico en otras líneas tumorales, fibroblastos y células de endotelio vascular (31).

La expresión basal de los NR4A es baja, y está regulada por una gran variedad de señales extracelulares como factores de crecimiento (Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)), aminas biogénicas (histamina, serotonina), y estímulos inflamatorios (LPS, TNF, lípidos oxidados). Su transcripción está mediada por varias vías de señalización: proteína cinasa (PK)A, PKC, MAPKs, proteínas G heterotriméricas, PI3K, Wnt, NF- $\kappa$ B y AP-1 (17, 30, 32, 33) (Fig. 3). La regulación de la expresión de los NR4A se produce a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional. En respuesta a estímulos inflamatorios, los genes NR4A se transcriben rápidamente, y forman parte de los genes de respuesta "temprana inmediata" (17, 34). Además, se ha descrito para Nur77 que su traducción está inhibida en M $\phi$  en reposo, pero tras 1 h de estimulación con LPS se promueve no sólo la transcripción del mRNA sino también su traducción, proceso que se ha asociado a la regulación a través de elementos ARE (*AU-rich elements*) en la región 3'UTR de su mRNA (35). La expresión y función de los NR4A está regulada también por fosforilaciones y SUMOilaciones, y ambas pueden conllevar un decremento o un incremento en la actividad de estas moléculas (23, 29, 36, 37). Se ha reportado que Nurr1 interactúa con la proteína inhibidora de STAT4 activado (Pias1, protein inhibitor of activated STAT4) (38) y se hipotetiza que la SUMOilación de Nurr1 en la K558 y K576 son requeridas para la actividad transcripcional de Nurr1 como monómero (29).

---



**Figura 3. Vías de señalización involucradas en la regulación de los receptores nucleares huérfanos NR4A y procesos celulares en los que estos receptores están involucrados.** Los receptores NR4A están involucrados en una gran variedad de funciones celulares incluyendo angiogénesis, apoptosis, metabolismo, migración, proliferación y reparación del DNA. La expresión de los receptores NR4A es inducida por una variedad de estímulos a través de múltiples vías de señalización celular, incluyendo proteína cinasa A (PKA)/CREB, NF- $\kappa$ B, (PI3K)/AKT, y MAPK. MAP, proteína activada por mitógenos; MC1R, receptor de melanocortina 1; PK, proteína cinasa; PKC, proteína cinasa C; PKD, proteína cinasa D; SRC-1, coactivador de receptores esteroides 1 (33).

#### 1.4. Nurr1 en la respuesta inflamatoria

La mayoría de los estudios encaminados a la identificación de los genes regulados por NR4A se han basado en el análisis de ratones deficientes de los mismos y en sistemas experimentales que implican su sobre-expresión en líneas celulares. Sin embargo, los resultados obtenidos no son siempre consistentes (39), debido en parte a los diferentes

contextos celulares evaluados. Además, la concentración intracelular de Nurr1 parece afectar el patrón de transcritos que regula (40), por lo que es posible que los ensayos que modulan artificialmente su expresión reflejen sólo una realidad parcial de su actividad.

Los receptores NR4A fueron descritos inicialmente como factores con una función pro-inflamatoria (32, 41). Sin embargo, estudios posteriores han sugerido que los TF NR4A pueden actuar como activadores o represores de las respuestas inflamatorias. Todos son regulados por estímulos inflamatorios y su expresión se induce en tejidos con patologías inflamatorias. Se ha observado la expresión de Nurr1 en tejido sinovial de individuos con RA, PsA, cáncer colorrectal, psoriasis, lesiones ateroscleróticas y esclerosis múltiple (42-50).

### **1.5. Expresión de Nurr1 en patologías inflamatorias**

#### **Artritis Reumatoide**

La modulación de la producción sinovial de hormona liberadora de corticotropina (CRH) es un componente importante del proceso inflamatorio, asociado con la enfermedad inflamatoria articular humana. La CRH induce el factor de transcripción Nurr1, lo que sugiere un papel significativo para este factor de transcripción en la mediación de los efectos intracelulares de la CRH sinovial, contribuyendo así al proceso patológico de la enfermedad (43).

Los genes que se expresan en sinoviocitos humanos y que han sido implicados en los mecanismos inflamatorios de la RA y la destrucción articular contienen un supuesto sitio de consenso de NBRE en sus regiones promotoras proximales. Esto respalda la teoría de que Nurr1 es un importante mediador transcripcional y de respuesta de citocinas pro-inflamatorias en la patogénesis de la enfermedad articular inflamatoria (43).

---

Una mayor expresión de Nurr1 en la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide (RA) sugiere un papel pro-inflamatorio para Nurr1 en la RA. La sobreexpresión de Nurr1 en células sinoviales humanas incrementa la expresión constitutiva e inducible por TNF de la quimiocina inflamatoria IL-8 (44, 45). En este último caso Nurr1 forma complejos con la subunidad de NF- $\kappa$ B p65 que inducen la transcripción de *IL8* (45). IL-8 tiene un papel establecido en el reclutamiento de neutrófilos a través de los receptores CXCR1/2. En este mismo sistema Nurr1 incrementa la síntesis de metaloproteinasa de matriz 13 (MMP13) en respuesta a TNF, mientras que disminuye la expresión del inhibidor de MMP TIMP-2 (46).

#### Cancer Colorrectal

Numerosos estudios demuestran el aumento de la ciclooxigenasa (COX)-2 en los sitios de inflamación, y en una variedad de tumores humanos, incluido el cáncer colorrectal. PGE<sub>2</sub> es la prostaglandina más abundante en cáncer colorrectal e induce la expresión y actividad de Nurr1 en células de carcinoma colorrectal intestinales y juega un papel significativo en la mediación de los efectos anti-apoptóticos de PGE<sub>2</sub> (47).

#### Psoriasis

Existe un aumento en la expresión de Nurr1 en la piel involucrada en la psoriasis comparada con la piel no involucrada y normal. Los niveles de Nurr1 endógeno aumentan rápida y selectivamente en respuesta a agonistas pro-inflamatorios y factores de crecimiento en células dérmicas endoteliales normales. Después de la inhibición de TNF- $\alpha$  los niveles de mRNA y proteína Nurr1 en la piel dañada disminuyen significativamente y se restaura la distribución citoplasmática. Estos hallazgos demuestran la expresión y distribución aberrante de Nurr1 en psoriasis y sugieren que los beneficios clínicos de la inhibición de TNF pueden estar mediados por la actividad alterada de Nurr1 (48).

---

### Esclerosis Múltiple

Nurr1 está fuertemente expresado en células T de la sangre periférica en individuos con esclerosis múltiple y juega un papel fundamental para mediar la producción de citocinas inflamatorias, incluyendo IL-17 e IFN- $\gamma$  de las células T patógenas. Por lo tanto, Nurr1 es un factor de transcripción esencial para desencadenar la cascada inflamatoria en la esclerosis múltiple y puede servir como un blanco terapéutico (49).

### Enfermedad de Parkinson

Nurr1 inhibe la expresión de mediadores pro-inflamatorios neurotóxicos tanto en microglía y astrocitos. La expresión reducida de Nurr1 resulta en una respuesta inflamatoria exagerada en microglía que es más amplificada por astrocitos, llevando a la producción de factores que causan la muerte de neuronas que expresan tirosina hidroxilasa. Nurr1 ejerce efectos antiinflamatorios por unión a NF- $\kappa$ B p65 en promotores de genes blanco inflamatorios. Subsecuentemente, Nurr1 recluta al complejo co-represor Co-REST, lo que resulta en el desacoplamiento de NF- $\kappa$ B p65 de las regiones promotoras y la represión transcripcional de sus genes blanco. Esto sugiere que Nurr1 protege contra la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson, en parte limitando la producción de mediadores neurotóxicos por parte de la microglía y de los astrocitos (29).

### Aterosclerosis

Los tres miembros de la familia NR4A se expresan en M $\phi$  de lesiones ateroescleróticas humanas, y estos factores reducen la absorción de lipoproteína oxidada de baja densidad (ox-LDL), lo que se correlaciona con la regulación negativa del receptor scavenger-A (SR-A) y la expresión de CD36, que han demostrado mejorar la formación de células espumosas y el tamaño de la lesión aterosclerótica. Además, los NR4A reducen la respuesta inflamatoria en M $\phi$  humanos dando como resultado una reducción significativa de la secreción inducida por LPS de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, lo que proporciona evidencia del papel protector de los factores de transcripción NR4A en la aterogénesis (50).

---

## 1.6. Efectos pro- y anti-inflamatorios de Nurr1

Los efectos pro- y anti-inflamatorios del receptor NR4A2 se han atribuido fundamentalmente a su interacción con NF- $\kappa$ B p65. Esta interacción depende de la fosforilación de p65 por la cinasa 3 de la glucógeno sintasa (GSK)3 $\beta$  en microglía (29). El heterodímero Nurr1-p65 puede unirse a los promotores de genes involucrados en la respuesta inflamatoria y activar (45) o inhibir (29) su transcripción. En ambos casos la actividad de Nurr1 no depende de su unión al DNA. Los mecanismos de activación no están bien esclarecidos. Los mecanismos de represión génica dependen del reclutamiento de complejos co-represores como CoREST (29). La asociación Nurr1-CoREST promueve la liberación de p65 de los promotores de sus genes blanco y la disminución subsecuente de la respuesta inflamatoria (29).

## 1.7. Los macrófagos como células clave del proceso inflamatorio

Los M $\phi$  son células del sistema inmune innato que presentan una gran diversidad de funciones, tanto homeostáticas como relacionadas con la defensa frente a patógenos y células tumorales. Son células clave en la iniciación, perpetuación, y resolución de los procesos inflamatorios (51). Los M $\phi$  son células complejas y con elevada plasticidad, capaces de adquirir diferentes características morfológicas y fisiológicas dependiendo del tipo de tejido y del microambiente inmunológico (52). En respuesta al daño tisular, los M $\phi$  inician una cascada inflamatoria que media el reclutamiento de leucocitos al tejido dañado. Los monocitos extravasados se diferencian *in situ* hacia M $\phi$  (53), e inicialmente se adaptan al microambiente inflamatorio del tejido adquiriendo las funciones de los denominados M $\phi$  polarizados M1 (54). *In vitro* estos M $\phi$  pueden ser generados con el cultivo de monocitos con lipopolisacárido bacteriano (LPS) y con citocinas como interferón (IFN)- $\gamma$ , o factor estimulante de colonias de granulocitos/M $\phi$  (GM-CSF) (55). Los M $\phi$  M1 se caracterizan por la secreción de citocinas inflamatorias [interleucina (IL)-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral (TNF), IL-6, IL-12, IL-23] y por su alta capacidad microbicida y tumoricida, y están implicados en el mantenimiento de las



respuestas de linfocitos Th1 y Th17 y en la defensa contra patógenos intracelulares. Tras un período agudo de inflamación se produce una disminución en la expresión de los factores que la caracterizan y un cambio en el perfil de la población macrofágica predominante, de pro-inflamatoria (M1) a anti-inflamatoria (polarización M2) (56). Los M $\phi$  M2 están asociados con la resolución de la inflamación, la eliminación de células muertas, la reparación del tejido, la proliferación de diversos tipos celulares (endotelios, fibroblastos), y la angiogénesis. Estos M $\phi$  modulan las respuestas de linfocitos Th2, y están involucrados en la defensa frente a parásitos. Pueden ser generados *in vitro* con citocinas de tipo Th2 (IL-4/IL-13), así como con factores inmunosupresores (IL-10, factor estimulante de colonias de M $\phi$  M-CSF), y secretan principalmente citocinas anti-inflamatorias (IL-10, antagonista del receptor de IL-1 -IL-1Ra-), así como diversos factores de crecimiento (PDGF, FGF, VEGF) (57-59).

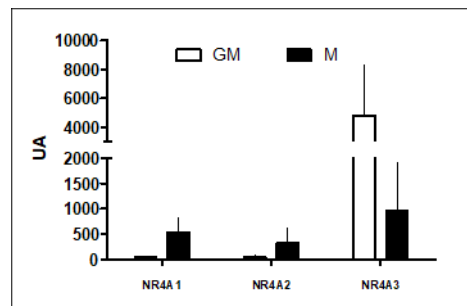
Se ha sugerido que Nurr1 inhibe los procesos inflamatorios al promover la polarización de los M $\phi$  hacia el fenotipo anti-inflamatorio M2. La sobre-expresión de Nurr1 en M $\phi$  de ratón derivados de médula ósea incrementa la expresión de genes relacionados con el fenotipo M2 (*il10*, *Arg1* -arginasa 1-, *Ym1* -quitinasa 3 tipo 3-) (60). Estos fenotipos de M $\phi$  han sido relacionados con algunas enfermedades. La transferencia de M $\phi$  que sobre-expresan Nurr1 en un modelo de sepsis inducida por LPS incrementa la supervivencia de los ratones (60). En humanos, el papel de Nurr1 como regulador transcripcional durante la polarización de los M $\phi$  aún es desconocido.

---

## II. ANTECEDENTES DIRECTOS

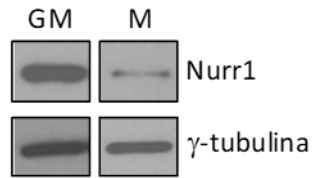
### 2.1. Expresión de los receptores NR4A en los M $\phi$ humanos

En nuestro laboratorio se realizó un estudio de microarreglos donde se describió la expresión diferencial de genes entre los M $\phi$  humanos con propiedades inflamatorias y anti-inflamatorias generados *in vitro* con GM-CSF (GM-M $\phi$ ) y M-CSF (M-M $\phi$ ), respectivamente, los cuales tienen propiedades similares a los M $\phi$  polarizados M1 y M2 mencionados anteriormente. En estos ensayos se detectó la expresión preferencial de NR4A1 y NR4A2 en los M-M $\phi$ , mientras que los transcritos de NR4A3 se observaron incrementados en los GM-M $\phi$  (Fig. 4).



**Figura 4. Expresión de los receptores NR4A en los macrófagos humanos polarizados.** Los M $\phi$  fueron generados mediante el cultivo de monocitos sanguíneos CD14<sup>+</sup> con las citocinas GM-CSF (GM) o M-CSF (M) durante 6 días. Pasado este tiempo se extrajo el RNA de las células y se realizaron microarreglos de expresión. Se muestra la expresión del mRNA de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en los M $\phi$  aislados de 3 donantes independientes, indicada como la media  $\pm$  SD.

Los tres receptores NR4A se analizaron a nivel de proteína, y se comprobó que Nur77 se expresa preferencialmente en los M-M $\phi$ , en concordancia con los resultados de los microarreglos de expresión. Sin embargo, NOR-1 no se detectó en ninguna de las poblaciones de M $\phi$  y, sorprendentemente, Nurr1 se detectó en mayor abundancia en los GM-M $\phi$  (Fig. 5). La mayor expresión de Nurr1 en los GM-M $\phi$  sugiere que su función podría estar relacionada con la actividad pro-inflamatoria de estas células.



**Figura 5. Expresión de Nurr1 en los macrófagos humanos polarizados.** Los M $\phi$  fueron generados mediante el cultivo de monocitos sanguíneos CD14<sup>+</sup> con las citocinas GM-CSF (GM) o M-CSF (M) durante 6 días. Pasado este tiempo las células se lisaron y se evaluó la expresión de Nurr1 mediante Western blot. La expresión de  $\gamma$ -tubulina se utilizó como control de carga.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Las enfermedades inflamatorias representan uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. Los macrófagos son células clave en la iniciación, perpetuación, y resolución de los procesos inflamatorios. Tras un período agudo de inflamación se produce un cambio en el perfil de la población macrofágica predominante de pro-inflamatoria (M1) a anti-inflamatoria (polarización M2), proceso que se asocia con la resolución de la inflamación. En las enfermedades inflamatorias crónicas la población de macrófagos predominante es la M1. La mayor expresión del factor de transcripción Nurr1 en los macrófagos M1 sugiere que su función podría estar relacionada con la actividad pro-inflamatoria de estas células. El conocimiento de la actividad y funcionalidad del receptor Nurr1 en la polarización de los macrófagos podría servir como base para proponer a Nurr1 como un blanco terapéutico y para diseñar estrategias para su modulación.

### **IV. HIPÓTESIS**

Nurr1 favorece la actividad inflamatoria de los macrófagos humanos.

---

## **V. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la regulación de la expresión y la actividad del receptor nuclear Nurr1 en los macrófagos humanos polarizados.

## **VI. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la cinética de expresión de Nurr1 en los M $\phi$  pro- (GM-M $\phi$ ) y anti-inflamatorios (M-M $\phi$ ) en respuesta a diferentes PAMPs.
  2. Evaluar la expresión de diversos marcadores de la polarización tras la activación y el silenciamiento de Nurr1.
  3. Evaluar la secreción de citocinas en los macrófagos pro- y anti-inflamatorios tras la activación con el agonista de Nurr1 C-DIM12 durante el proceso de diferenciación.
-

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Aislamiento de monocitos

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

### 7.2. Generación de GM-M $\phi$ y M-M $\phi$

Los monocitos CD14+ fueron cultivados a una densidad de 0.5-0.7 x 10<sup>6</sup> células/mL en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina y 1% antibióticos. El medio fue suplementado con GM-CSF (1000 U/mL, ProBiomed) o con M-CSF (10 ng/mL, Calbiochem) añadidos cada 2 días (día 0, día 2 y día 4) para inducir la diferenciación de los monocitos hacia GM-M $\phi$  o M-M $\phi$  respectivamente. En algunos experimentos los monocitos fueron diferenciados en presencia del agonista de Nurr1 C-DIM12 (0.1 o 1.0  $\mu$ M, Sigma-Aldrich). Ocasionalmente, en el sexto día de diferenciación los M $\phi$  fueron estimulados con peptidoglicano (PGN, [10  $\mu$ g/m], InvivoGen), ácido poliinosínico-policitídílico [poly (I:C), [50  $\mu$ g/m], InvivoGen], o lipopolisacárido (LPS) de E. coli (cepa) ([100 ng/mL], Sigma-Aldrich).

---

### 7.3. Ensayos de Western blot

Los GM-M $\phi$  y M-M $\phi$  fueron recolectados al sexto día de diferenciación y lisados con 5% SDS. Los lisados totales, fueron resuspendidos en buffer de carga y resueltos en SDS-PAGE al 10% bajo condiciones reductoras. A continuación, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con TBS-T (0.2 M Tris-HCl, 1.37 M NaCl, 0.1% Tween 20) y leche en polvo al 5% durante 1 h a temperatura ambiente, lavadas con TBS-T, e incubadas con los Ab primarios anti-Nurr1 (Santa Cruz Biotechnology.) o  $\gamma$ -tubulina (Sigma-Aldrich) diluidos 1:1000 y 1:5000 respectivamente en TBS-T con 0.1% BSA 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) y para el análisis densitométrico de las bandas se empleó el software Fiji (*Fiji Is Just ImageJ*).

### 7.4. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó con el reactivo Trizol® (Ambion). Se añadieron 400  $\mu$ L de trizol a 5-7 x 10<sup>6</sup> células (GM-M $\phi$  y M-M $\phi$ ). Posteriormente, la mezcla se agitó en vórtex y se conservó 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 80  $\mu$ L de cloroformo, se agitó por 15 seg y la mezcla se conservó 3 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 200  $\mu$ 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 400  $\mu$ L de 75% etanol diluido en agua con dietilpirocarbonato (DEPC), se mezcló y se centrifugó nuevamente a 8,000 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el RNA se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua-DEPC. El RNA se incubó a 60°C por 10 min y finalmente se cuantificó y evaluó su integridad en un gel de agarosa al 1%.

---

### 7.5. Análisis de expresión de transcritos por PCR cuantitativa

Una vez obtenido el RNA, el cDNA se obtuvo utilizando el Kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific). Posteriormente se realizó el análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa (q-PCR) 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 (25 ng)

PCR (45 ciclos)				
	Incubación UNG	Activación AmpliTaq Gold	Desnaturalización	Alineamiento/ Extensión
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tiempo	2 min	10 min	15 seg	1 min

Los valores de  $\Delta Ct$  (*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  $Q_r = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ , donde el  $\Delta\Delta Ct$  entre dos condiciones se calculó con la siguiente fórmula:

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

### 7.6. Inhibición de la vía de NF-κB en GM-Mφ y M-Mφ

Los Mφ fueron cultivados y diferenciados en placas de 12 pozos (GM-Mφ=500 cel/mL y M-Mφ= 700 cel/mL en 1.5 mL de medio y al sexto día de diferenciación fueron



tratados por 1 h con el inhibidor de la vía de NF- $\kappa$ B BAY-11-7082 (10  $\mu$ M) o con 0.01% DMSO como control. Posteriormente se estimuló a los GM-M $\phi$  (4 h) y a los M-M $\phi$  (1 h) con LPS (100 ng/mL), se extrajo el RNA y se midió el mRNA de Nurr1 mediante q-PCR.

### 7.7. Silenciamiento de Nurr1

Los GM-M $\phi$  y M-M $\phi$  fueron transfectados con un siRNA dirigido contra el mRNA de Nurr1 al cuarto día de diferenciación utilizando la tecnología de *HiPerFect Transfection Reagent* (Qiagen), la cual se basa en la formación de complejos entre los siRNA y lípidos catiónicos. El medio de cultivo fue reemplazado por 200  $\mu$ L de medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB. En un tubo de poliestireno de fondo redondo estéril se preparó la mezcla de siRNA (específico de Nurr1 o un control negativo) que consistió en 200  $\mu$ L de RPMI 1640 (sin SFB), 12  $\mu$ L de siRNA (concentración final 100 nM, Ambion.), y 12  $\mu$ L de *HiPerFect Transfection Reagent*. La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de transfección. Transcurrido dicho tiempo, la mezcla fue adicionada gota a gota de manera uniforme por todo el pozo de cultivo y las células se incubaron durante 6 h en condiciones normales de 37°C y atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Pasadas las 6 h se adicionaron 800  $\mu$ L de medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB y se adicionaron las citocinas polarizantes GM-CSF y M-CSF. El RNA y la proteína se extrajeron 48 h después de la transfección, mediante el kit NucleoSpin® RNA/Protein (Macherey-Nagel). El análisis de silenciamiento de Nurr1 fue evaluado por q-PCR y mediante western blot. Posteriormente se evaluaron mediante q-PCR los siguientes genes: *TNF*, *IL1B*, *IL6*, *INHBA* y *CLEC5A* (marcadores de la polarización M1), e *IL10*, *CCL2*, *IFNB*, *IL8*, *MMP9* y *CD163L1* (marcadores de la polarización M2).

---

### **7.8. Activación de Nurr1 con su agonista C-DIM12 durante la diferenciación de los macrófagos**

Los GM-M $\phi$  M-M $\phi$  se cultivaron y diferenciaron en placas de 12 pozos en presencia o ausencia del agonista de Nurr1 C-DIM12 (0.1 y 1.0  $\mu$ M, Sigma Aldrich), añadido cada 2 días, en las siguientes condiciones: 0.01% DMSO (control), C-DIM12 0.1  $\mu$ M y C-DIM12 1  $\mu$ M, tanto para GM-M $\phi$  como M-M $\phi$ . En el 6° día de diferenciación se añadió una vez más el agonista y a las 4 h se recolectaron las células, se lisaron con 0.4 mL de Trizol para posteriormente extraer el RNA y realizar RT-qPCR para los siguientes genes: *TNF*, *IL1B*, *IL6*, *INHBA*, *CLEC5A*, *IL10*, *CCL2* y *CD163L1*.

Para evaluar la producción de citocinas en estos M $\phi$ , en el sexto día de diferenciación se recogieron los sobrenadantes de cultivo (producción basal de citocinas) y las células fueron tratadas con LPS (100 ng/mL) durante 18 h. Una vez terminado el tiempo de estimulación el sobrenadante fue recolectado y guardado a -80°C hasta su análisis mediante kits de ELISA comerciales (BD Biosciences) para TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10.

### **7.9. Análisis estadístico**

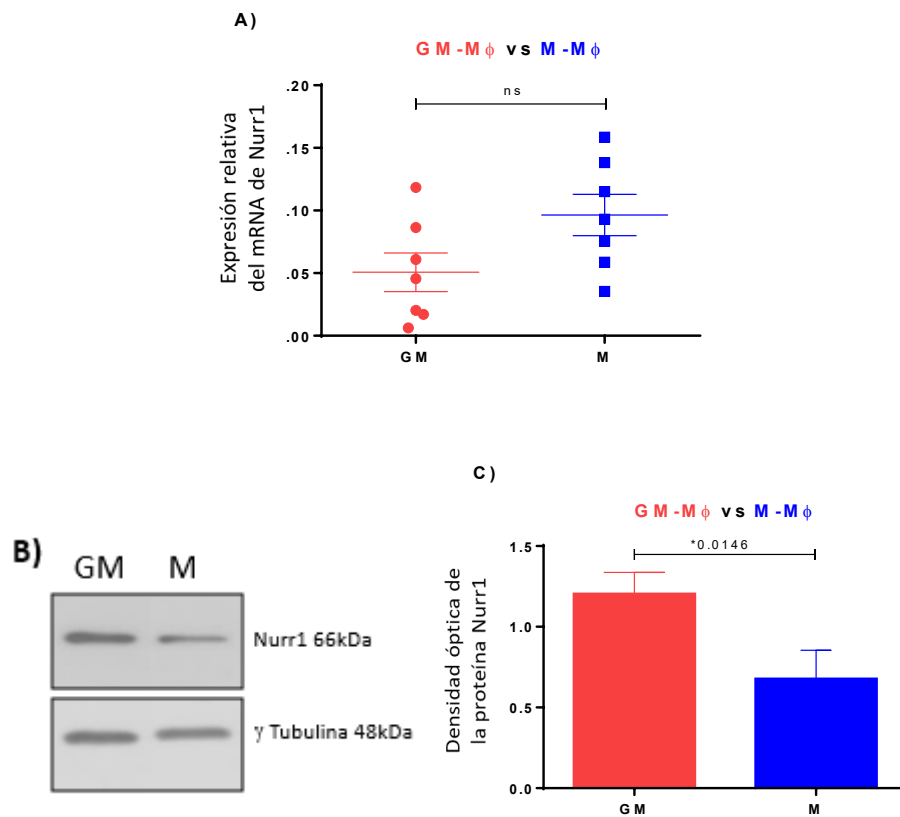
El análisis estadístico se realizó utilizando los paquetes Excel y GraphPad Prism versión 6.01. Se utilizó el test paramétrico *t* de Student y los grupos de valores se expresaron como la media  $\pm$  SD. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

---

## VIII. RESULTADOS

### 8.1. Expresión basal de Nurr1 en M $\phi$ pro- (GM-M $\phi$ ) y anti-inflamatorios (M-M $\phi$ )

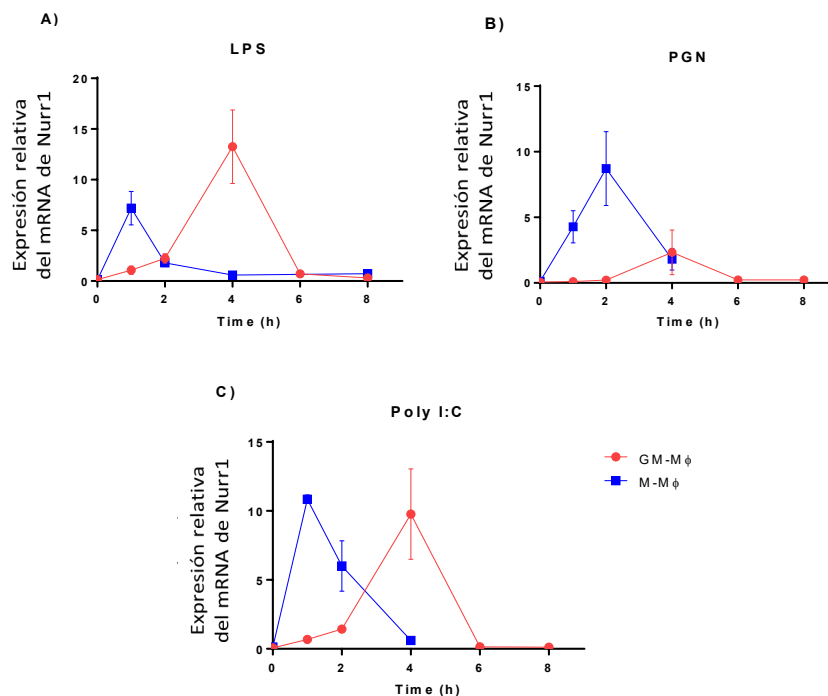
Se evaluó la expresión del mRNA y la proteína de Nurr1 en ambas poblaciones de M $\phi$ . Para ello se obtuvo el RNA y la proteína de los GM-M $\phi$  y M-M $\phi$  diferenciados durante seis días y se evaluó el mRNA y la proteína de Nurr1 mediante q-PCR y western blot respectivamente (Fig. 6). Los resultados indican que, a nivel de mRNA de Nurr1 no existe diferencia entre una población y otra, mientras que a nivel de proteína los GM-M $\phi$  expresaron mayores niveles de la proteína de Nurr1 respecto a los M-M $\phi$ .



**Figura 6. Expresión basal del mRNA y de la proteína de Nurr1 en macrófagos pro- y anti-inflamatorios.** Expresión de *NR4A2*, evaluada mediante RT-qPCR (A), y de Nurr1, evaluada mediante Western blot (B) en los GM-M $\phi$  (GM) y M-M $\phi$  (M) obtenidos tras seis días de diferenciación. (C) Análisis densitométrico de la expresión de Nurr1 con respecto a  $\gamma$ -tubulina. Se muestra la expresión del mRNA y la proteína de Nurr1 en los M $\phi$  aislados de 7 y 3 donantes independientes respectivamente, indicada como la media  $\pm$  SD.

## 8.2. Cinética de expresión de *NR4A2* en respuesta a distintos PAMPs

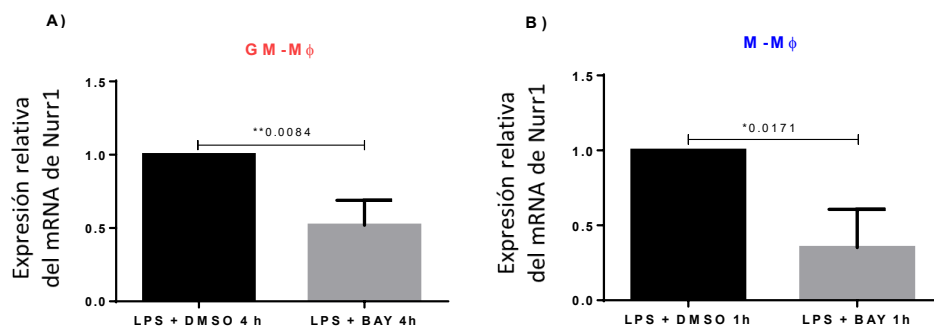
Con base en los reportes que existen acerca de que el LPS induce la expresión de *NR4A2* y de *Nurr1* en células de microgliales BV2 (25) y mielomonocíticas THP-1 (45), y en la amplia evidencia que apunta a la vía de señalización de NF- $\kappa$ B como mediadora de la expresión de los receptores NR4A, se decidió evaluar la cinética de expresión del mRNA de *Nurr1* en respuesta a diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como el ligando del receptor tipo toll (TLR)2 PGN, el ligando de TLR3 poly (I:C), y el ligando de TLR4 LPS (Fig. 7). La inducción de *NR4A2* se evaluó tras 0, 1, 2, 4, 6 y 8 h de exposición a los estímulos. En respuesta a LPS se observó un pico de inducción a las 4h en los GM-M $\phi$  y a 1h en los M-M $\phi$ , regresando a los niveles basales a las 6 y 4h respectivamente. Tras el estímulo con PGN se observó un pico de inducción a las 4h en los GM-M $\phi$  y a las 2h en los M-M $\phi$ , el nivel de inducción en los GM-M $\phi$  fue menor, mientras que en los M-M $\phi$  fue mayor respecto a los observados tras el estímulo con LPS. En respuesta al estímulo con poly (I:C), se observó un pico de inducción a las 4h en los GM-M $\phi$  y a 1h en los M-M $\phi$ , regresando a los niveles basales a las 6 y 4h respectivamente, el nivel de inducción alcanzado en los M-M $\phi$  fue mayor, mientras que en los GM-M $\phi$  fue similar a los observados tras el estímulo de LPS. Los resultados indican que los tres ligandos indujeron un incremento en la expresión de *NR4A2* en ambas poblaciones de M $\phi$ . Las cinéticas de expresión fueron muy similares, presentando un pico de inducción a las 4 h en los GM-M $\phi$  y más temprano (1 h) en los M-M $\phi$ , tras los estímulos con LPS y poly (I:C), y a las 2 h tras el estímulo con PGN en los M-M $\phi$ . Además las diferencias en los niveles de inducción sugieren una mayor importancia de la vía de señalización independiente de MyD88 en la expresión de *Nurr1*.



**Figura 7. Cinética de expresión de NR4A2 en respuesta a distintos PAMPs.** Cinética de expresión del mRNA de Nurr1 en los GM-Mφ y M-Mφ sin estimular (0 h) y a los tiempos de 1, 2, 4, 6 y 8 h tras el estímulo con LPS (100 ng/mL) (A), PGN (10 μg/mL) (B) y poly I:C (50 μg/mL) (C), evaluada mediante RT-qPCR. Se muestra la expresión del mRNA de NR4A2 en los Mφ aislados de 6 donantes independientes tras el estímulo de LPS y de 3 donantes independientes tras los estímulos de PGN y de poly I:C, indicada como la media ± SD.

### 8.3. La inhibición de la vía de NF-κB disminuye la expresión de NR4A2

Como primer acercamiento para elucidar las vías de señalización que inducen la expresión de NR4A2, evaluamos la expresión de este gen ambas poblaciones de Mφ tras la inhibición de la vía de NF-κB (Fig. 8). Para ello empleamos el reactivo BAY-11-7082, un inhibidor irreversible de IKKα y de la fosforilación de IκBα, añadido 1 h antes del estímulo con LPS. La expresión de NR4A2 se evaluó mediante RT-qPCR en los tiempos correspondientes al pico de expresión tras el estímulo con LPS en cada una de las poblaciones de Mφ (4 h para GM-Mφ y 1 h para M-Mφ).



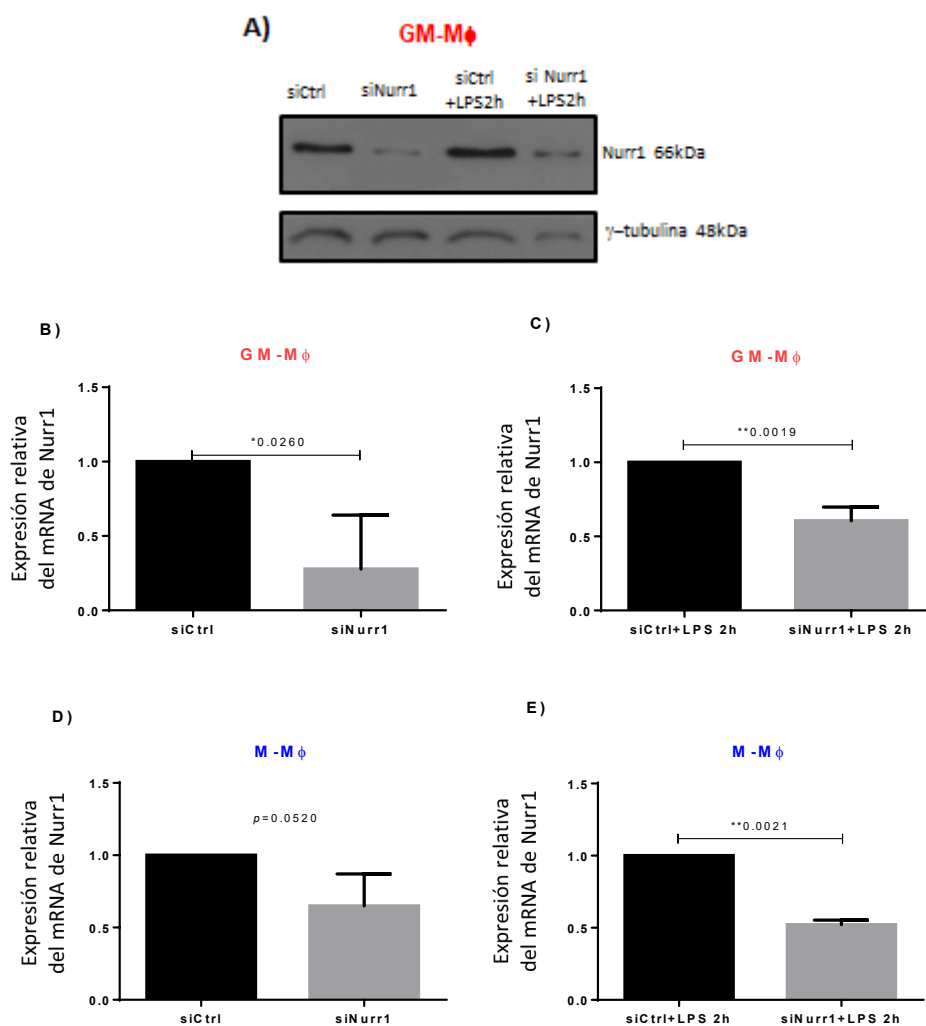
**Figura 8. Expresión de NR4A2 tras la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B.** Expresión relativa de NR4A2 tras la estimulación de los GM-M $\phi$  (A) y M-M $\phi$  (B) con LPS (100 ng/mL), en presencia del inhibidor de la vía de NF- $\kappa$ B BAY-11-7082 (10  $\mu$ M) o de DMSO (0.01%) como control, añadidos 1 h antes del estímulo. Las células fueron colectadas tras 1 h (M-M $\phi$ ) o 4 h (GM-M $\phi$ ) de estimulación con LPS. Las gráficas representan la expresión relativa de NR4A2 en los macrófagos tratados con BAY-11-7082 con respecto a los tratados con DMSO. Se muestran las medias  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. El test *t* de Student se aplicó para determinar las diferencias entre las medias, y se muestran los valores de *p*.

Los niveles de inducción del mRNA de Nurr1 en respuesta al LPS se redujeron en ambas poblaciones de M $\phi$  tras el bloqueo de la vía de NF- $\kappa$ B, sin ser abatidos por completo. Este resultado sugiere que la vía de NF- $\kappa$ B esta involucrada en la inducción de la expresión de NR4A2 en respuesta a LPS, aunque probablemente existen otras vías involucradas.

#### 8.4. Generación de M $\phi$ deficientes en la expresión de Nurr1

Nuestro siguiente objetivo fue realizar el *knockdown* de Nurr1 en los GM-M $\phi$  y M-M $\phi$  a través de la transfección de un siRNA dirigido contra el mRNA de Nurr1. La transfección del siRNA se realizó en el cuarto día de diferenciación, se adicionaron las citocinas polarizantes GM-CSF y M-CSF, se incubaron los M $\phi$  48 h más para completar el proceso de diferenciación y finalmente se extrajeron tanto el RNA como la proteína para su análisis. Los resultados del *knockdown* de Nurr1 en los GM-M $\phi$  y en los M-M $\phi$  se muestran en la Fig. 9, donde se puede observar que tanto la proteína (Fig. 9A) como el mRNA de Nurr1 (Fig. 9B-E) disminuyeron sus niveles de expresión

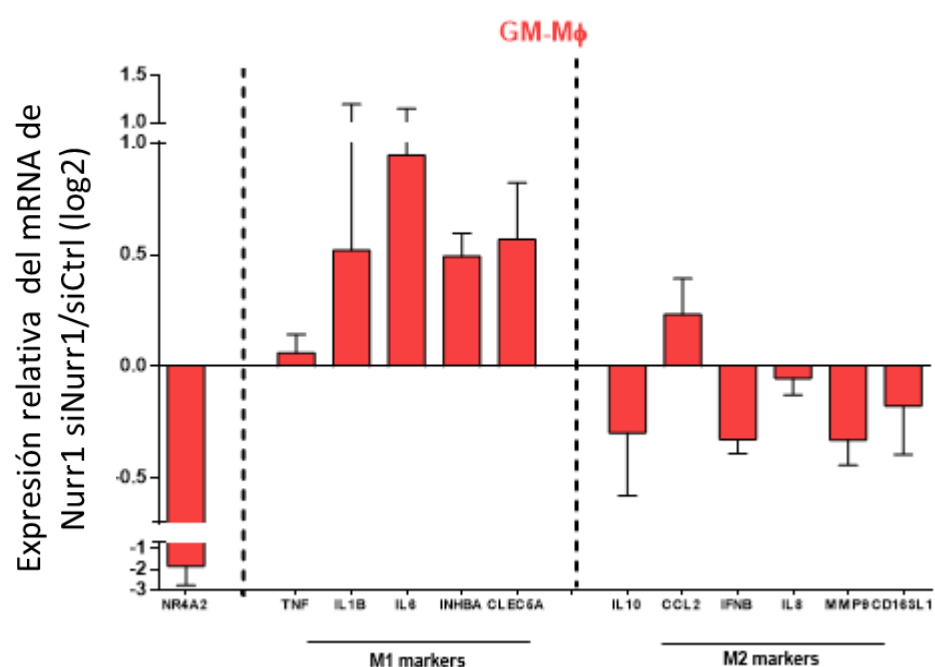
tras el silenciamiento. Además, el abatimiento de la expresión de *NR4A2* permaneció en ambas poblaciones de  $M\phi$  aún tras el estímulo con LPS (Fig. 9C, 9E). El mRNA disminuyó su expresión aproximadamente en un 50% con respecto a la condición de transfección con el siRNA control.



**Figura 9. Expresión de la proteína y del mRNA de Nurr1 tras los ensayos de silenciamiento del RNA.** Expresión proteica de Nurr1 evaluada mediante Western blot en los GM-M $\phi$  (A) y expresión relativa de *NR4A2* evaluada mediante RT-qPCR en los GM-M $\phi$  (B y C) y en los M-M $\phi$  (D y E). Los macrófagos se analizaron tras el silenciamiento de Nurr1 con un siRNA dirigido contra el mRNA de Nurr1 (siNurr1, 100 nM) o un control negativo (siCtrl, 100 nM). La qPCR se realizó en M $\phi$  en condiciones basales (B y D) y en M $\phi$  estimulados con LPS (100 ng/mL) durante 2 h (C y E). Se muestran las medias  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. El test *t* de Student se aplicó para determinar las diferencias entre las medias en (B-D), y se muestran los valores de *p*.

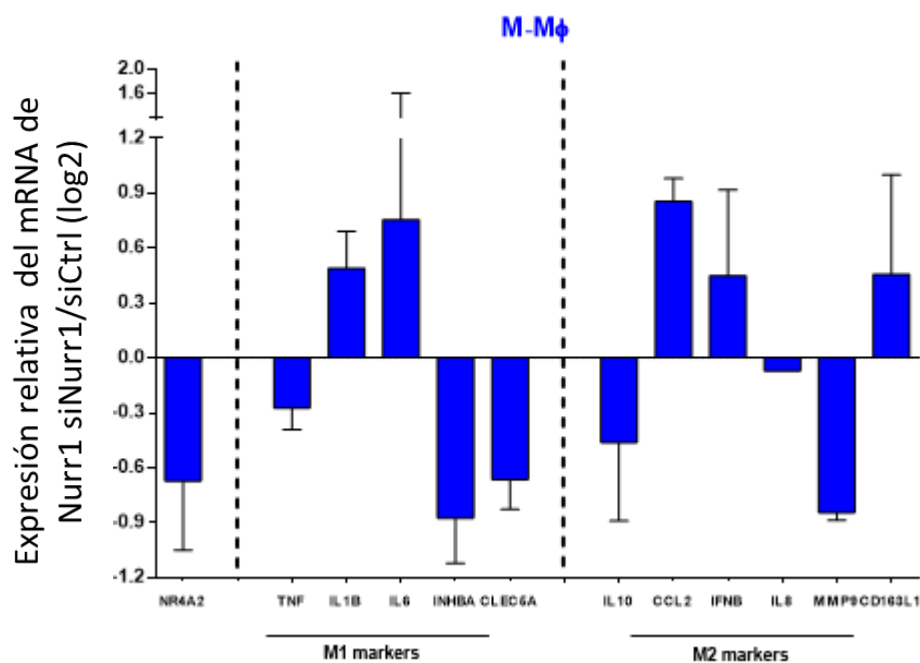
### 8.5. Nurr1 es un regulador negativo de la función inflamatoria de los GM-M $\phi$

De manera interesante, en los GM-M $\phi$  transfectados con el siNurr1 se observó una inducción en la expresión de los genes asociados a la polarización M1 y una inhibición de los genes correspondientes al fenotipo M2 (Fig. 10). Sin embargo, en los M-M $\phi$  los resultados fueron más heterogéneos, presentando tanto inducción como supresión de la expresión de genes correspondientes a ambos fenotipos (Fig. 11).



**Figura 10. Expresión de marcadores de polarización en GM-M $\phi$  transfectados con el siNurr1.** Se evaluó, el cambio en la expresión de genes asociados al fenotipo M1 (*TNF*, *IL1B*, *IL6*, *INHBA* y *CLEC5A*), genes asociados a un fenotipo M2 (*IL10*, *CCL2*, *IFNB*, *IL8*, *MMP9* y *CD163L1*), así como de *NR4A2*, en los GM-M $\phi$  tras el silenciamiento de Nurr1 con un siRNA dirigido contra el mRNA de Nurr1 (100 nM) o un siRNA control (siCtrl, 100 nM). La gráfica representa el cambio en la expresión relativa del mRNA de los genes evaluados en los macrófagos transfectados con el siRNA dirigido contra el mRNA de Nurr1 con respecto a los tratados con el siCtrl, que corresponden al valor de 0, en valores logarítmicos. Se muestran las medias  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.





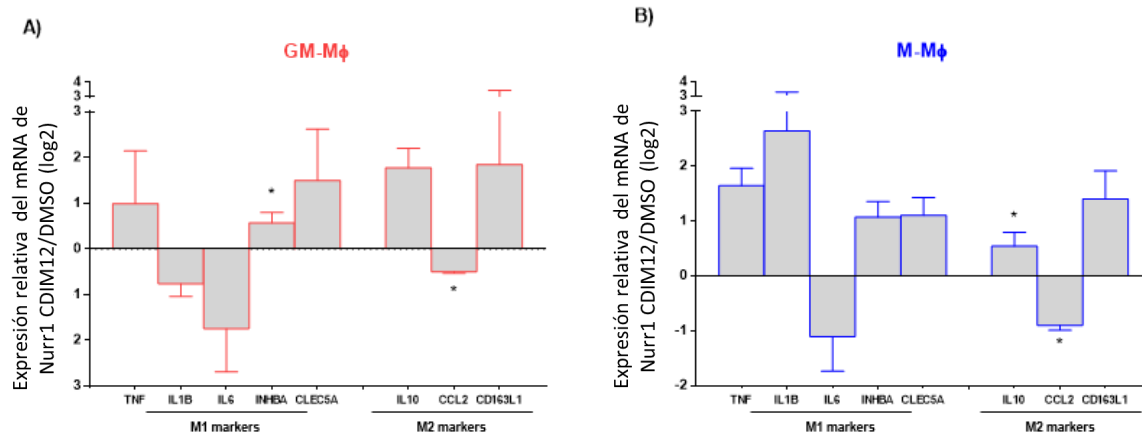
**Figura 11. Expresión de marcadores de polarización en M-M $\phi$  transfectados con el siNurr1.** Se evaluó, el cambio en la expresión de genes asociados al fenotipo M1 (*TNF*, *IL1B*, *IL6*, *INHBA* y *CLEC5A*), genes asociados a un fenotipo M2 (*IL10*, *CCL2*, *IFNB*, *IL8*, *MMP9* y *CD163L1*), así como de *NR4A2*, en los M-M $\phi$  tras el silenciamiento de Nurr1 con un siRNA dirigido contra el mRNA de Nurr1 (100 nM) o un siRNA control (siCtrl, 100 nM). La gráfica representa el cambio en la expresión relativa del mRNA de los genes evaluados en los macrófagos transfectados con el siRNA dirigido contra el mRNA de Nurr1 con respecto a los tratados con el siCtrl, que corresponden al valor de 0, en valores logarítmicos. Se muestran las medias  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

En conjunto, estos datos sugieren que Nurr1 es un regulador negativo de la función inflamatoria en las GM-M $\phi$ , pero no en los M-M $\phi$ .

### 8.6. La activación de Nurr1 durante el proceso de diferenciación no modifica de manera global la polarización de los M $\phi$

Con el fin de analizar si la activación de Nurr1 durante el proceso de diferenciación influye en el fenotipo final de los M $\phi$ , éstos se diferenciaron en presencia o ausencia del agonista de Nurr1 C-DIM12, añadido cada 2 días. En el 6° día de diferenciación se añadió una vez más el agonista y a las 4 h se recolectaron las células y se extrajo el

RNA, para evaluar los cambios en la expresión de los genes *TNF*, *IL1B*, *IL6*, *INHBA* y *CLEC5A* como marcadores del fenotipo M1, e *IL10*, *CCL2* y *CD163L1* como marcadores del fenotipo M2 (Fig. 12).

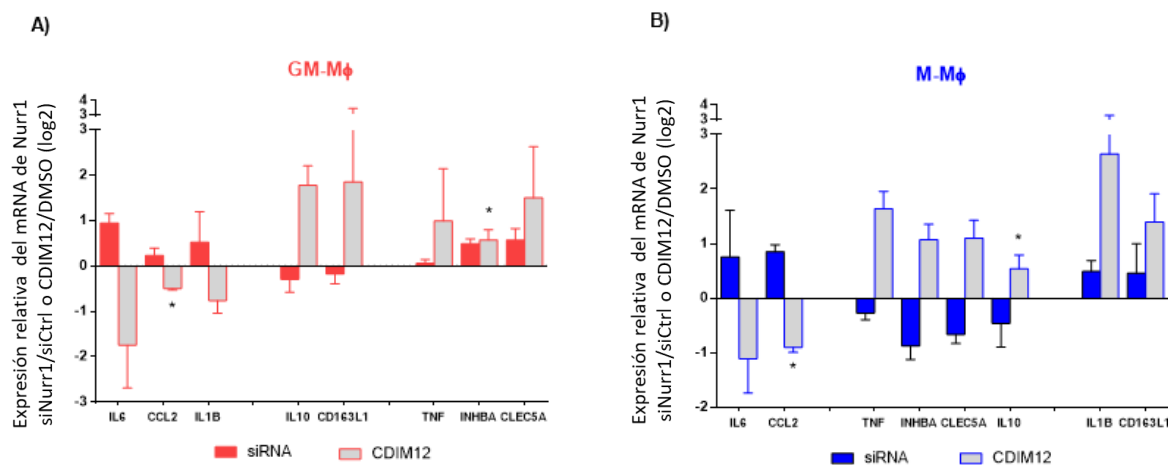


**Figura 12. Marcadores de la polarización tras la activación de Nurr1 con el agonista C-DIM12 durante el proceso de diferenciación.** Los GM-Mφ y M-Mφ se cultivaron y diferenciaron en presencia o ausencia del agonista de Nurr1 C-DIM12 (0.1 y 1.0 μM), añadido cada 2 días, con las siguientes condiciones: DMSO (control, 0.01%), C-DIM12 0.1 μM y, C-DIM12 1 μM. En el día 6° de diferenciación se añadió una vez más el agonista y a las 4 h se recolectaron las células, se extrajo el RNA, y se realizó RT-qPCR para analizar el cambio en la expresión de genes asociados al fenotipo M1 (*TNF*, *IL1B*, *IL6*, *INHBA* y *CLEC5A*) y al fenotipo M2 (*IL10*, *CCL2* y *CD163L1*). En las gráficas se representa el cambio en la transcripción génica cuando las células fueron diferenciadas en presencia de C-DIM12 con respecto a la condición control con DMSO (valor de 0), en valores logarítmicos. Se muestran las medias ± SD de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los macrófagos control (DMSO) y los macrófagos tratados con C-DIM12 (\* $p < 0.05$ ).

En ambas poblaciones de Mφ se observó tanto inducción como supresión de genes asociados tanto al fenotipo M1, así como al fenotipo M2, lo cual nos sugiere que, a nivel génico, la activación de Nurr1 durante el proceso de diferenciación no modifica de manera global la polarización de los Mφ.

## 8.7. Comparación de los genes regulados tras la inducción o supresión de la actividad de Nurr1

Con el fin de elucidar los posibles genes blanco de Nurr1 se comparó el cambio en la expresión génica en los GM-M $\phi$  y M-M $\phi$  con las metodologías de silenciamiento de Nurr1 y de activación de Nurr1 con el agonista C-DIM12 (Fig. 13).



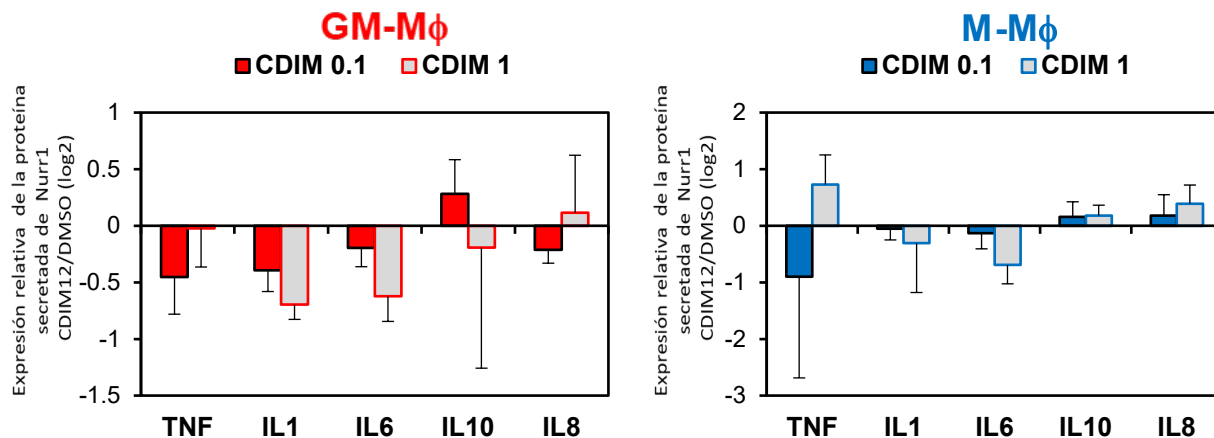
**Figura 13. Cambios en la expresión de genes asociados a los fenotipos M1 y M2 tras el silenciamiento o la activación de Nurr1.** Se realizó la comparación del cambio en la expresión génica de IL6, CCL2, IL-10, IL1B, TNF, INHBA, CLEC5A y CD163L1 tras el silenciamiento de Nurr1 (siRNA) o tras la activación de Nurr1 con un agonista (C-DIM12), como se indica en las Fig. 10, 11 y 12. Las gráficas muestran el cambio en la expresión de los genes indicados en los GM-M $\phi$  y M-M $\phi$ , siendo el valor de 0 la condición control (siCtrl o macrófagos diferenciados en presencia de DMSO). Se muestran las medias  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los macrófagos control (siCtrl o DMSO) y los macrófagos tratados con siNurr1 o C-DIM12 (\* $p$ <0.05).

En ambas poblaciones de M $\phi$  se detectaron genes que fueron regulados de manera inversa tras el silenciamiento y la activación de Nurr1, como *IL6*, *CCL2*, *IL1B*, *IL10* y *CD163L1* en los GM-M $\phi$ , e *IL6*, *CCL2*, *TNF*, *INHBA*, *CLEC5A* e *IL10* en los M-M $\phi$ . Además, se observaron genes que no tuvieron este comportamiento y cuya expresión se indujo con ambas metodologías, como *TNF*, *INHBA* y *CLEC5A* en los GM-M $\phi$ , e *IL1B* y *CD163L1* en los M-M $\phi$ .

De manera interesante, se identificaron tres genes, *IL6*, *CCL2* e *IL10*, cuyo comportamiento fue el mismo en ambas poblaciones de M $\phi$ . *IL6* y *CCL2* mostraron una inducción en su expresión tras el silenciamiento de Nurr1 y una inhibición tras la activación de Nurr1 con C-DIM12, tanto en GM-M $\phi$  como en M-M $\phi$ . *IL10* mostró una inhibición en su expresión tras el silenciamiento de Nurr1 y una inducción tras la activación de Nurr1 con su agonista. En conjunto, estos resultados sugieren que *IL6*, *CCL2* e *IL10* podrían ser genes que estén regulados de manera directa por Nurr1.

### 8.8. La activación de Nurr1 durante el proceso de diferenciación atenúa la capacidad inflamatoria de los M $\phi$ humanos en respuesta a LPS

A continuación, determinamos si la activación de Nurr1 C-DIM12 durante el proceso de diferenciación modificaba el perfil inflamatorio de los GM-M $\phi$  y M-M $\phi$  mediante el análisis de su secreción de citocinas en respuesta a LPS (Fig. 14).



**Figura 14. Secreción de citocinas en los macrófagos tras la activación con el agonista de Nurr1 C-DIM12 durante su proceso de diferenciación.** Los GM-M $\phi$  y M-M $\phi$  se cultivaron y diferenciaron en presencia o ausencia del agonista de Nurr1 C-DIM12, añadido cada 2 días, con las siguientes condiciones: DMSO (control, 0.01%), C-DIM12 0.1  $\mu$ M, y C-DIM12 1  $\mu$ M. En el día 6° de las células fueron tratadas con LPS (100 ng/mL) durante 18 h y se evaluó la producción de citocinas indicadas en los sobrenadantes de cultivo mediante la técnica de ELISA. En las gráficas se representa el cambio en la producción de citocinas cuando las células fueron diferenciadas en presencia de C-DIM12 con respecto a la condición control con DMSO (valor de 0), en valores logarítmicos. Se muestran las medias  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes.

La secreción de IL-1 e IL-6 disminuyó con C-DIM12 en ambas poblaciones de M $\phi$  de manera dependiente de la concentración. Además, la secreción de TNF disminuyó, y la de IL-10 se incrementó, en los GM-M $\phi$  tratados con C-DIM12 a una concentración de 0.1  $\mu$ M. Por lo tanto, la activación de Nurr1 durante el proceso de diferenciación de los M $\phi$  parece atenuar su capacidad de secretar mediadores inflamatorios en respuesta a LPS, actividad que es más evidente en los GM-M $\phi$ .

---

## IX. DISCUSIÓN

Es importante conocer el papel del receptor nuclear Nurr1, ya que es un factor de transcripción que puede participar como un regulador clave de los procesos inflamatorios, ya sea activando o inhibiendo la respuesta inflamatoria. Se ha descrito la expresión de Nurr1 en muestras de tejido asociado a diferentes patologías inflamatorias como la artritis reumatoide, psoriasis, enfermedades inflamatorias intestinales, cáncer, lesiones ateroscleróticas, esclerosis múltiple, o enfermedades cardiovasculares y metabólicas. Una de las células clave en la regulación de la respuesta inflamatoria son los M $\phi$ , los cuales pueden polarizarse a un fenotipo proinflamatorio (GM-M $\phi$ ) o un fenotipo antiinflamatorio (M-M $\phi$ ). Teniendo como antecedentes en nuestro laboratorio que existe una mayor expresión de Nurr1 en los GM-M $\phi$  humanos de individuos sanos en comparación con los M-M $\phi$  (Fig. 5), en el presente trabajo se planteó como objetivo evaluar la regulación de la expresión y la actividad del receptor nuclear Nurr1 en los M $\phi$  humanos polarizados. Al evaluar la expresión basal de *NR4A2* en los GM-M $\phi$  y M-M $\phi$  se encontró que no existe diferencia entre una población y otra, mientras que a nivel de proteína los GM-M $\phi$  expresaron mayores niveles de Nurr1 con respecto a los M-M $\phi$  (Fig. 6). Hasta este momento no se ha reportado la expresión diferencial de Nurr1 en los M $\phi$  humanos polarizados. Estos resultados indican que existe una regulación post-transcripcional diferencial en ambos tipos celulares, por lo cual sería interesante evaluar la vida media de *NR4A2*, así como la tasa de degradación de la proteína en ambos tipos de M $\phi$ . De igual manera sería interesante evaluar la presencia de moléculas que puedan estar regulando post-transcripcionalmente a *NR4A2*. Por ejemplo, se ha descrito en otros modelos celulares que los microRNAs miR-132 y miR-145-5p inhiben post-transcripcionalmente la traducción de Nurr1 (61-64). Además, la mayor expresión de Nurr1 en los GM-M $\phi$  sugiere que este factor de transcripción podría tener un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria en estas células, así como en el mantenimiento de las características fenotípicas de esta población de M $\phi$ .

---

*NR4A2* es un gen de respuesta inmediata temprana, que se transcribe rápidamente en respuesta a estímulos inflamatorios (17, 34). Existen reportes que muestran, la inducción de la expresión de Nurr1 en cultivos primarios de microglía y de astrocitos de ratón en respuesta al estímulo de LPS (ligando de TLR4) durante 12 h, así como la inducción del mRNA en células BV2 de microglía de ratón y en cultivos primarios de microglía humana tras el estímulo de 6 h con LPS (29). También se ha demostrado la inducción temprana de la expresión del mensajero de *NR4A2* en respuesta a LPS en células mielomonocíticas humanas THP-1, con un pico de expresión tras 1 h de tratamiento (32). Además, Mahajan et al. han reportado la inducción tanto del mRNA como de la proteína en respuesta a LPS en M $\phi$  murinos derivados de medula ósea (BMDM); así como la expresión de la proteína en BMDMs y M $\phi$  peritoneales en respuesta a LPS, zymosan (ligando de TLR2) y poly (I:C) (ligando de TLR3) (60). De igual manera se ha visto la inducción de la transcripción de *NR4A1* (gen que codifica Nurr77), otro miembro de la familia de receptores nucleares NR4A, en células RAW264.7 en respuesta a LPS, poly (I:C) y LTA (ligando de TLR2) (32).

Todos estos hallazgos nos llevaron a evaluar la cinética de expresión de *NR4A2* en GM-M $\phi$  y M-M $\phi$  en respuesta a distintos PAMPs (Fig. 7). Las cinéticas de expresión de *NR4A2* en ambas poblaciones de M $\phi$  humanos en respuesta a ligandos de TLR2, 3 y 4 fueron similares, presentando un pico de inducción a las 4 h en los GM-M $\phi$  y más temprano (1 h), tras los estímulos con LPS y poly (I:C), y a las 2 h tras el estímulo con PGN en los M-M $\phi$ . Cabe mencionar que la activación de los TLRs puede inducir la expresión génica por medio de la regulación tanto de la actividad como de la expresión de distintos factores de transcripción como son NF- $\kappa$ B, AP-1 y la familia IRF, mediante dos vías, una vía dependiente de la proteína adaptadora MyD88 (compartida por todos los TLRs a excepción de TLR3) y la otra vía independiente de MyD88 (65). La inducción más temprana de *NR4A2* en los M-M $\phi$  sugiere una mayor disponibilidad de los factores de transcripción necesarios para iniciar la transcripción de Nurr1, o bien una mayor accesibilidad al promotor de Nurr1 de estos factores de transcripción. Además, los mayores niveles de inducción de

*NR4A2* observados tras la activación de TLR3 y TLR4 con respecto a TLR2 sugiere una mayor importancia de la vía de señalización independiente de MyD88 para la expresión de *Nurr1*.

Numerosos estudios apuntan a la vía de señalización NF- $\kappa$ B como un mediador principal de la expresión de los receptores de la familia NR4A (32, 66, 67). Por ejemplo, en los M $\phi$  murinos RAW264.7 tras la incubación con inhibidores específicos para las vías de señalización de MAPK, NF- $\kappa$ B y PI3K, sólo la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B inhibió de manera significativa la inducción de *Nur77* en respuesta a LPS (32). Además, la mutación de los elementos de respuesta a NF- $\kappa$ B en el promotor de *Nurr77* en estas células disminuyó de manera significativa su inducción en respuesta a distintos TLRs (2, 3 y 4) aunque no por completo, sugiriendo la participación de otras vías de señalización (32).

Se ha reportado la presencia de elementos de respuesta a NF- $\kappa$ B y a CREB conservados en el promotor de *Nurr1* de humano y de ratón y se ha demostrado la importancia de estos sitios para la inducción transcripcional de *NR4A2* en respuesta a TNF, IL-1 $\beta$  y PGE<sub>2</sub> en células K4IM de sinoviocitos humanos (66). Con el fin de elucidar las vías de señalización y los factores de transcripción que inducen la expresión de *NR4A2*, decidimos evaluar los niveles de expresión de este gen en ambas poblaciones de M $\phi$  tras la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B, mediante el empleo de BAY-11-7082 (Fig. 8). Los resultados muestran una disminución significativa en los niveles de inducción del mRNA de *NR4A2* en respuesta al tratamiento con LPS en ambas poblaciones de M $\phi$  tras el bloqueo de la vía de NF- $\kappa$ B, sin ser abatidos por completo. Este resultado sugiere que la vía de NF- $\kappa$ B está fuertemente involucrada en la inducción de la expresión de *NR4A2* en respuesta a LPS en ambas poblaciones de M $\phi$ , sin embargo, deben de existir otras vías involucradas.

Se ha demostrado que el *knockdown* de *Nurr1* en células BV2 de microglía de ratón aumenta la expresión de *TNF*, *iNOs* e *IL1B* tanto en condiciones basales como en respuesta a LPS, por lo cual se propone que *Nurr1* ejerce efectos anti-inflamatorios en estas células (29). Además, en M $\phi$  humanos de lesiones ateroscleróticas (M $\phi$



---

con un perfil pro-inflamatorio), se ha demostrado la expresión de los tres miembros de la familia NR4A. Además, la sobre-expresión de cualquiera de estos factores de transcripción reduce la respuesta inflamatoria en respuesta a LPS de M $\phi$  humanos THP-1 y U937, disminuyendo la expresión de citocinas y quimiocinas de carácter pro-inflamatorio (50). Con la finalidad de elucidar el papel de Nurr1 en la regulación de la respuesta inflamatoria de los GM-M $\phi$  y los M-M $\phi$ , así como en el mantenimiento de las características fenotípicas de cada una de estas poblaciones celulares, en nuestro grupo de investigación decidimos evaluar la expresión génica de diversos marcadores fenotípicos de la polarización de los M $\phi$  (*TNF*, *IL1B*, *IL6*, *INHBA* y *CLEC5A* como marcadores del fenotipo M1, e *IL10*, *CCL2* y *CD163L1* como marcadores del fenotipo M2) tras el silenciamiento de Nurr1 o la activación de éste durante el proceso de diferenciación, mediante el empleo del agonista de Nurr1 C-DIM12.

Los resultados observados tras el silenciamiento de Nurr1 muestran de manera interesante una inducción de la expresión génica de marcadores asociados a la polarización M1 y una inhibición de los genes evaluados como marcadores de la polarización M2 en los GM-M $\phi$  transfectados con el siNurr1 (Fig. 10). Sin embargo, en los M-M $\phi$  transfectados con el siNurr1 los resultados fueron más heterogéneos, presentando tanto inducción como supresión de la expresión de genes correspondientes a ambos fenotipos (Fig. 11). En conjunto, estos datos sugieren que Nurr1 es un regulador negativo de la función inflamatoria en los GM-M $\phi$  pero no en los M-M $\phi$ , apoyando así el papel previamente descrito de Nurr1 en la regulación de la respuesta inflamatoria en células BV2, THP-1 y U937 (29, 50).

Mahajan et al. reportaron que la sobre-expresión de Nurr1 en BMDMs indujo una expresión incrementada de genes asociados al fenotipo M2 (arginasa 1, Ym1, receptor de manosa), así como una disminución de la expresión de genes relacionados con la polarización M1 (CXCL9). Además, se comprobó que la sobre-expresión de Nurr1 está asociada con un incremento en la secreción de IL-10 y una disminución en la secreción tanto de TNF como de IL-12p70. Por lo tanto, los autores sugieren que Nurr1 promueve la polarización de los M $\phi$  hacia un fenotipo M2

---

(60). En nuestro trabajo analizamos la expresión de genes M1 y M2 después del proceso de diferenciación de los M $\phi$  con el agonista de Nurr1 C-DIM12 (Fig. 12), y encontramos tanto inducción como supresión de genes asociados a ambos fenotipoa en ambas poblaciones de M $\phi$ . Esto sugiere que, a nivel génico, la activación de Nurr1 durante el proceso de diferenciación no modifica de manera global la polarización de los M $\phi$ . Estos resultados difieren con lo reportado previamente por Mahajan et al. (60), donde la sobreexpresión de Nurr1 en BMDM de ratón promueve la polarización de los M $\phi$  hacia un fenotipo M2. Las diferencias encontradas en ambos trabajos podrían explicarse debido al empleo de diferentes modelos celulares, así como a la estrategia experimental utilizada (sobre-expresión vs activación de Nurr1).

Por otra parte, con el fin de elucidar los posibles genes blanco de Nurr1 se comparó el cambio en la expresión génica en los GM-M $\phi$  y M-M $\phi$  con las metodologías de silenciamiento y de activación de Nurr1 (Fig. 13). De manera interesante, se identificaron tres genes, *IL6*, *CCL2* e *IL10*, cuyo comportamiento fue el mismo en ambas poblaciones de M $\phi$ . *IL6* y *CCL2* mostraron una inducción en su expresión tras el silenciamiento de Nurr1 y una inhibición tras la activación de Nurr1 con C-DIM12. De manera contraria, *IL10* mostró una inhibición en su expresión tras el silenciamiento de Nurr1 y una inducción tras la activación de Nurr1 con su agonista. En conjunto, estos resultados sugieren que Nurr1 es un factor de transcripción importante para la síntesis de *IL6*, *CCL2* e *IL10* en los M $\phi$ , modulando negativamente la expresión de *IL6* y *CCL2* y positivamente la expresión de *IL10*. Estos datos concuerdan con lo previamente descrito en células THP-1, donde la sobre-expresión de Nurr1 reduce los niveles de inducción de *IL6* y de *CCL2*, así como los niveles de *CCL2* en células U937, en ambos casos en respuesta a LPS (50).

Finalmente, se evaluó si la activación de Nurr1 durante el proceso de diferenciación alteraba la respuesta inflamatoria en GM-M $\phi$  y M-M $\phi$  posterior al tratamiento con LPS, mediante el análisis de la secreción de citocinas. La producción de IL-1 e IL-6 disminuyó tras la activación de Nurr1 en ambas poblaciones de M $\phi$ , aunque de

manera más relevante en los GM-M $\phi$ . Además, la secreción de TNF disminuyó, y la de IL-10 se incrementó, en los GM-M $\phi$ . Por lo tanto, la activación de Nurr1 durante el proceso de diferenciación de los M $\phi$  parece atenuar su capacidad de secretar mediadores inflamatorios en respuesta a LPS, actividad que es más evidente en los GM-M $\phi$ . Estos resultados concuerdan con lo previamente descrito por Bonta et al., en donde la sobreexpresión de Nurr1 reduce los niveles de secreción de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 en células THP-1, así como de IL-8 e IL-6 en M $\phi$  U937 en respuesta a LPS (50).

La evidencia obtenida en el presente trabajo aporta información sobre la funcionalidad del receptor nuclear Nurr1 en los M $\phi$  humanos polarizados, evidenciando un papel anti-inflamatorio en los GM-M $\phi$ .

---

## X. CONCLUSIONES

1. Los niveles de expresión de *NR4A2* son similares en los macrófagos M1 y M2, aunque los primeros muestran un incremento en los niveles proteicos de Nurr1, lo que evidencia una regulación postranscripcional diferencial en ambas poblaciones de macrófagos.
  2. El gen *NR4A2* se induce en los macrófagos en respuesta a distintos PAMPs. Su expresión está mediada por la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a LPS, aunque nuestros resultados sugieren la participación de otras vías de señalización en la regulación de su expresión génica.
  3. A nivel génico, la activación de Nurr1 durante el proceso de diferenciación de los macrófagos no modifica de manera global su polarización.
  4. Nurr1 es un factor de transcripción relevante para la síntesis de *IL6*, *CCL2* e *IL10* en los macrófagos humanos, y actúa tanto activando (*IL10*) como reprimiendo (*IL6*, *CCL2*) la transcripción génica.
  5. Nurr1 actúa como un regulador negativo de la función inflamatoria de los macrófagos, y esta actividad es más prominente en los macrófagos de tipo M1.
-

## XI. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la estabilidad del mRNA y la tasa de degradación de Nurr1 con el fin de explicar su expresión diferencial en los GM-M $\phi$  en comparación con los M-M $\phi$ .
  2. Evaluar la participación de las vías de señalización de las MAPK y de PI3K en la regulación de la expresión de Nurr1 mediante el empleo de distintos inhibidores farmacológicos.
  3. Evaluar si los genes de *IL6*, *CCL2* e *IL10* están regulados directamente por Nurr1 mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina.
-

---

## XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Standiford, T., Kunkel, S., Basha, M., Chensue, S., Lynch, J., & Toews, G. et al. (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. doi: 10.1172/jci114928
  2. Ritchlin, C. (2000). Fibroblast biology Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Research*, 2(5), 356-360. doi: 10.1186/ar112
  3. Verstrepen, L., Bekaert, T., Chau, T., Tavernier, J., Chariot, A., & Beyaert, R. (2008). TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-κB: variations on a common theme. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 65(19), 2964-2978. doi: 10.1007/s00018-008-8064-8
  4. Wagner, E., & Eferl, R. (2005). Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunological Reviews*, 208(1), 126-140. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00332.x
  5. Kondo, T., Kawai, T., & Akira, S. (2012). Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends In Immunology*, 33(9), 449-458. doi: 10.1016/j.it.2012.05.002
  6. Levi, M., Wang, X., & Choudhury, D. (2011). Nuclear Hormone Receptors as Therapeutic Targets. *Contributions To Nephrology*, 209-216. doi: 10.1159/000325668
  7. Giguère, V. (1999). Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function1. *Endocrine Reviews*, 20(5), 689-725. doi: 10.1210/edrv.20.5.0378
  8. Pascual, G., & Glass, C. (2006). Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends In Endocrinology & Metabolism*, 17(8), 321-327. doi: 10.1016/j.tem.2006.08.005
  9. Ortega-Domínguez, B., Herrera-Ramírez, M., & Tecalco-Cruz, A. (2015). Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma. *tip*, 18(2), 131-143. doi: 10.1016/j.recqb.2015.09.005
  10. Roshan-Moniri, M., Hsing, M., Butler, M., Cherkasov, A., & Rennie, P. (2014). Orphan nuclear receptors as drug targets for the treatment of prostate and breast cancers. *Cancer Treatment Reviews*, 40(10), 1137-1152. doi: 10.1016/j.ctrv.2014.10.005
-

- 
11. Zhan, Y., Chen, Y., Zhang, Q., Zhuang, J., Tian, M., & Chen, H. et al. (2012). The orphan nuclear receptor Nur77 regulates LKB1 localization and activates AMPK. *Nature Chemical Biology*, 8(11), 897-904. doi: 10.1038/nchembio.1069
  12. Hu, Y., Zhang, P., Yang, J., Huang, J., Ma, X., & Li, S. et al. (2014). Nur77 Decreases Atherosclerosis Progression in apoE<sup>-/-</sup> Mice Fed a High-Fat/High-Cholesterol Diet. *Plos ONE*, 9(1), e87313. doi: 10.1371/journal.pone.0087313
  13. Milbrandt, J. (1988). Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron*, 1(3), 183-188. doi: 10.1016/0896-6273(88)90138-9
  14. Law, S., Conneely, O., DeMayo, F., & O'Malley, B. (1992). Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Molecular Endocrinology*, 6(12), 2129-2135. doi: 10.1210/mend.6.12.1491694
  15. 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. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure And Expression*, 1308(3), 205-214. doi: 10.1016/0167-4781(96)00101-7
  16. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., & Laudet, V. (2006). Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), 685-704. doi: 10.1124/pr.58.4.2
  17. Martinez-Gonzalez, J., & Badimon., L. (2005). The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovascular Research*, 65(3), 609-618. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.10.002
  18. Barish, G., Downes, M., Alaynick, W., Yu, R., Ocampo, C., & Bookout, A. et al. (2005). A Nuclear Receptor Atlas: Macrophage Activation. *Molecular Endocrinology*, 19(10), 2466-2477. doi: 10.1210/me.2004-0529
  19. Tel-Karhaus, N., Kers-Rebel, E., Looman, M., Ichinose, H., de Vries, C., & Ansems, M. (2018). Nuclear Receptor Nur77 Deficiency Alters Dendritic Cell Function. *Frontiers In Immunology*, 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01797
  20. Sekiya, T., Kashiwagi, I., Inoue, N., Morita, R., Hori, S., & Waldmann, H. et al. (2011). The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates
-

---

differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature Communications*, 2(1). doi: 10.1038/ncomms1272

21. Sekiya, T., Hibino, S., Saeki, K., Kanamori, M., Takaki, S., & Yoshimura, A. (2018). Nr4a Receptors Regulate Development and Death of Labile Treg Precursors to Prevent Generation of Pathogenic Self-Reactive Cells. *Cell Reports*, 24(6), 1627-1638.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.008

22. Zhao, Y., & Bruemmer, D. (2009). NR4A orphan nuclear receptors in cardiovascular biology. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 6(1-4), e43-e48. doi: 10.1016/j.ddmec.2009.06.001

23. Safe, S., Jin, U., Morpurgo, B., Abudayyeh, A., Singh, M., & Tjalkens, R. (2016). Nuclear receptor 4A (NR4A) family – orphans no more. *The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology*, 157, 48-60. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.04.016

24. Wilson, T., Fahrner, T., Johnston, M., & Milbrandt, J. (1991). Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science*, 252(5010), 1296-1300. doi: 10.1126/science.1925541

25. Philips, A., Lesage, S., Gingras, R., Maira, M., Gauthier, Y., Hugo, P., & Drouin, J. (1997). Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Molecular And Cellular Biology*, 17(10), 5946-5951. doi: 10.1128/mcb.17.10.5946

26. Perlmann, T., & Jansson, L. (1995). A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes & Development*, 9(7), 769-782. doi: 10.1101/gad.9.7.769

27. Wansa, K., Harris, M., & Muscat E. (2002). The Activation Function-1 Domain of Nur77/NR4A1 Mediates Trans-activation, Cell Specificity, and Coactivator Recruitment. *Journal Of Biological Chemistry*, 277(36), 33001-33011. doi: 10.1074/jbc.m203572200

28. Palumbo-Zerr, K., Zerr, P., Distler, A., Fliehr, J., Mancuso, R., & Huang, J. et al. (2015). Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor- $\beta$  signaling and fibrosis. *Nature Medicine*, 21(2), 150-158. doi: 10.1038/nm.3777

---



- 
29. Saijo, K., Winner, B., Carson, C., Collier, J., Boyer, L., & Rosenfeld, M. et al. (2009). A Nurr1/CoREST Pathway in Microglia and Astrocytes Protects Dopaminergic Neurons from Inflammation-Induced Death. *Cell*, 137(1), 47-59. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.038
  30. Maxwell & Muscat. (2006). The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nuclear Receptor Signaling*, 4. doi: 10.1621/nrs.04002
  31. Niu, G., Lu, L., Gan, J., Zhang, D., Liu, J., & Huang, G. (2014). Dual Roles of Orphan Nuclear Receptor TR3/Nur77/NGFI-B in Mediating Cell Survival and Apoptosis. *International Review Of Cell And Molecular Biology*, 219-258. doi: 10.1016/b978-0-12-800177-6.00007-4
  32. 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. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(32), 29256-29262. doi: 10.1074/jbc.m502606200
  33. Mohan, H., Aherne, C., Rogers, A., Baird, A., Winter, D., & Murphy, E. (2012). Molecular Pathways: The Role of NR4A Orphan Nuclear Receptors in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(12), 3223-3228. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-11-2953
  34. Baillie, J., Arner, E., Daub, C., De Hoon, M., Itoh, M., & Kawaji, H. et al. (2017). Analysis of the human monocyte-derived macrophage transcriptome and response to lipopolysaccharide provides new insights into genetic aetiology of inflammatory bowel disease. *PLOS Genetics*, 13(3), e1006641. doi: 10.1371/journal.pgen.1006641.
  35. 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 Genetics*, 10(6), e1004368. doi: 10.1371/journal.pgen.1004368
  36. Zhang, L., Xie, F., Zhang, J., Dijke, P., & Zhou, F. (2017). SUMO-triggered ubiquitination of NR4A1 controls macrophage cell death. *Cell Death And Differentiation*, 24(9), 1530-1539. doi: 10.1038/cdd.2017.29
-

- 
37. Li, L., Liu, Y., Chen, H., Li, F., Wu, J., & Zhang, H. et al. (2015). Impeding the interaction between Nur77 and p38 reduces LPS-induced inflammation. *Nature Chemical Biology*, 11(5), 339-346. doi: 10.1038/nchembio.1788
  38. Galleguillos, D., Vecchiola, A., Fuentealba, J., Ojeda, V., Alvarez, K., Gómez, A., & Andrés, M. (2003). PIAS $\gamma$  Represses the Transcriptional Activation Induced by the Nuclear Receptor Nurr1. *Journal Of Biological Chemistry*, 279(3), 2005-2011. doi: 10.1074/jbc.m308113200
  39. Jacobs, F., van der Linden, A., Wang, Y., von Oerthel, L., Sul, H., Burbach, J., & Smidt, M. (2009). Identification of Dlk1, Ptpru and Kihl1 as novel Nurr1 target genes in meso-diencephalic dopamine neurons. *Development*, 136(14), 2363-2373. doi: 10.1242/dev.037556
  40. Johnson, M., Michelhaugh S., Bouhamdan M., Schmidt C., & Bannon M. (2011). The transcription factor NURR1 exerts concentration-dependent effects on target genes mediating distinct biological processes. *Frontiers In Neuroscience*, 5. doi: 10.3389/fnins.2011.00135
  41. Pei, L., Castrillo, A., & Tontonoz, P. (2006). Regulation of Macrophage Inflammatory Gene Expression by the Orphan Nuclear Receptor Nur77. *Molecular Endocrinology*, 20(4), 786-794. doi: 10.1210/me.2005-0331
  42. McMorrow, J., & Murphy, E. (2011). Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors?. *Biochemical Society Transactions*, 39(2), 688-693. doi: 10.1042/bst0390688
  43. Murphy, E., McEvoy, A., Conneely, O., Bresnihan, B., & FitzGerald, O. (2001). Involvement of the nuclear orphan receptor NURR1 in the regulation of corticotropin-releasing hormone expression and actions in human inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 44(4), 782-793. doi: 10.1002/1529-0131(200104)44:4<782::aid-anr134>3.0.co;2-h
  44. Davies, M., Harding, C., Raines, S., Tolley, K., Parker, A., Downey-Jones, M., & Needham, M. (2005). Nurr1 dependent regulation of pro-inflammatory mediators in immortalised synovial fibroblasts. *Journal Of Inflammation*, 2(1), 15. doi: 10.1186/1476-9255-2-15
-

- 
45. Aherne, C., McMorrow, J., Kane, D., FitzGerald, O., Mix, K., & Murphy, E. (2009). Identification of NR4A2 as a transcriptional activator of IL-8 expression in human inflammatory arthritis. *Molecular Immunology*, 46(16), 3345-3357. doi: 10.1016/j.molimm.2009.07.019
  46. Mix, K., McMahon, K., McMorrow, J., Walkenhorst, D., Smyth, A., & Petrella, B. et al. (2012). Orphan nuclear receptor NR4A2 induces synoviocyte proliferation, invasion, and matrix metalloproteinase 13 transcription. *Arthritis & Rheumatism*, 64(7), 2126-2136. doi: 10.1002/art.34399
  47. Holla, V., Mann, J., Shi, Q., & DuBois, R. (2005). Prostaglandin E2Regulates the Nuclear Receptor NR4A2 in Colorectal Cancer. *Journal Of Biological Chemistry*, 281(5), 2676-2682. doi: 10.1074/jbc.m507752200
  48. O'Kane, M., Markham, T., McEvoy, A., Fearon, U., Veale, D., & FitzGerald, O. et al. (2008). Increased Expression of the Orphan Nuclear Receptor NURR1 in Psoriasis and Modulation following TNF- $\alpha$  Inhibition. *Journal Of Investigative Dermatology*, 128(2), 300-310. doi: 10.1038/sj.jid.5701023
  49. Doi, Y., Oki, S., Ozawa, T., Hohjoh, H., Miyake, S., & Yamamura, T. (2008). Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 105(24), 8381-8386. doi: 10.1073/pnas.0803454105
  50. Bonta, P. van Tiel C., Vos M., Pols T., van Thienen J., Ferreira V. et al. (2006). Nuclear Receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 Expressed in Atherosclerotic Lesion Macrophages Reduce Lipid Loading and Inflammatory Responses. *Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology*, 26(10), 2288-2288. doi: 10.1161/01.atv.0000238346.84458.5d
  51. Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in Inflammation. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*, 4(3), 281-286. doi: 10.2174/1568010054022024
  52. Mantovani, A., Sica, A., & Locati, M. (2005). Macrophage Polarization Comes of Age. *Immunity*, 23(4), 344-346. doi: 10.1016/j.immuni.2005.10.001
  53. Tacke, F., & Randolph, G. (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*, 211(6-8), 609-618. doi: 10.1016/j.imbio.2006.05.025
-

- 
54. Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., & Plonquet, A. et al. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal Of Experimental Medicine*, 204(5), 1057-1069. doi: 10.1084/jem.20070075
  55. Martinez, F., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Reports*, 6. doi: 10.12703/p6-13
  56. Stout, R., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S., & Suttles, J. (2005). Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. *The Journal Of Immunology*, 175(1), 342-349. doi: 10.4049/jimmunol.175.1.342
  57. Mosser, D., & Edwards, J. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958-969. doi: 10.1038/nri2448
  58. Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal Of Clinical Investigation*, 122(3), 787-795. doi: 10.1172/jci59643
  59. Gonzalez-Dominguez, E., Samaniego, R., Flores-Sevilla, J., Campos-Campos, S., Gomez-Campos, G., & Salas, A. et al. (2015). CD163L1 and CLEC5A discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo. *Journal Of Leukocyte Biology*, 98(4), 453-466. doi: 10.1189/jlb.3hi11114-531r
  60. Mahajan, S., Saini, A., Chandra, V., Nanduri, R., Kalra, R., & Bhagyaraj, E. et al. (2015). Nuclear Receptor Nr4a2 Promotes Alternative Polarization of Macrophages and Confers Protection in Sepsis. *Journal Of Biological Chemistry*, 290(30), 18304-18314. doi: 10.1074/jbc.m115.638064
  61. Yang, D., Li, T., Wang, Y., Tang, Y., Cui, H., & Tang, Y. et al. (2012). miR-132 regulates the differentiation of dopamine neurons by directly targeting Nurr1 expression. *Journal Of Cell Science*, 125(7), 1673-1682. doi: 10.1242/jcs.086421
  62. Lungu, G., Stoica, G., & Ambrus, A. (2019). MicroRNA profiling and the role of microRNA-132 in neurodegeneration using a rat model. *Neuroscience Letters* 553, 153– 158. doi: 10.1016/j.neulet.2013.08.001
  63. Wu, S., Sun, H., Zhang, Q., Jiang, Y., Fang, T., & Cui, I. et al. (2015). MicroRNA-132 promotes estradiol synthesis in ovarian granulosa cells via
-

translational repression of Nurr1. *Reproductive Biology And Endocrinology*, 13(1). doi: 10.1186/s12958-015-0095-z

64. Xie, X., Peng, L., Zhu, J., Zhou, Y., Li, L., & Chen, Y. et al. (2017). miR-145-5p/Nurr1/TNF- $\alpha$  Signaling-Induced Microglia Activation Regulates Neuron Injury of Acute Cerebral Ischemic/Reperfusion in Rats. *Frontiers In Molecular Neuroscience*, 10. doi: 10.3389/fnmol.2017.00383

65. Kawai, T., & Akira, S. (2007). TLR signaling. *Seminars In Immunology*, 19(1), 24-32. doi: 10.1016/j.smim.2006.12.004

66. McEvoy, A., Murphy, E., Ponnio, T., Conneely, O., Bresnihan, B., FitzGerald, O., & Murphy, E. (2002). Activation of Nuclear Orphan Receptor NURR1 Transcription by NF- $\kappa$ B and Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate Response Element-Binding Protein in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue. *The Journal Of Immunology*, 168(6), 2979-2987. doi: 10.4049/jimmunol.168.6.2979

67. Murphy, E., & Crean, D. (2015). Molecular Interactions between NR4A Orphan Nuclear Receptors and NF- $\kappa$ B Are Required for Appropriate Inflammatory Responses and Immune Cell Homeostasis. *Biomolecules*, 5(3), 1302-1318. doi: 10.3390/biom5031302

---