



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
ANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Zacatenco  
Departamento de Biomedicina Molecular

**“Función del receptor nuclear Nurr1 en los  
macrófagos humanos polarizados”**

TESIS  
que presenta:  
**Miguel Ángel Solís Barbosa**

Para obtener el grado de  
**Doctor en Ciencias**  
**en la Especialidad de Biomedicina Molecular**

Directora de tesis:  
**Dra. María Carmen Sánchez Torres**

Ciudad de México

Febrero 2024

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

Dr. Vianney Fco. Ortiz Navarrete

Departamento de biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón

Consorcio Oncogenómica y Enfermedades Óseas  
(INMEGEN)

El M. en C. Miguel Ángel Solís Barbosa realizó esta tesis de doctorado con una beca otorgada por CONAHCYT

---

## AGRADECIMIENTOS

- Al CONAHCYT por el apoyo económico facilitado a través de la beca CVU: 858215 para el desarrollo de estudios de doctorado.
  - Al CINVESTAV por permitirme formar parte de esta magnífica institución y realizar mis estudios de doctorado.
  - A los Bancos de sangre del centro Médico Nacional “La Raza” y Hospital Ticomán 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 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, María Guadalupe Guzmán y Julio Ramírez por su apoyo y excelente trabajo.
  - A mi compañero de laboratorio, Eduardo Santana Cisneros por hacer tan agradable el ambiente en el laboratorio, por toda su ayuda, consejos, risas y buenos momentos que pasamos juntos.
  - A los Doctores y compañeros del Departamento de Biomedicina Molecular por las facilidades y disponibilidad del uso de los equipos pertenecientes a sus laboratorios.
  - Y de manera muy especial a mi familia, mis padres Gloria Barbosa Sabanero y Miguel Ángel Solís Martínez, y a mi hermana Fernanda Solís Barbosa, gracias por todo su apoyo, pero sobre todo por su cariño.
-

**ÍNDICE**

ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS .....	7
RESUMEN EN ESPAÑOL .....	12
RESUMEN EN INGLÉS.....	13
I. INTRODUCCIÓN.....	14
Macrófagos.....	14
Origen de los macrófagos .....	14
Polarización M1 y M2 .....	18
Macrófagos generados a partir de GM-CSF y M-CSF .....	21
La vía de señalización de NF- $\kappa$ B .....	22
Los receptores nucleares y sus mecanismos de acción.....	26
Receptores nucleares como reguladores de la función de los macrófagos.....	30
Familia de receptores nucleares huérfanos NR4A.....	35
Receptores NR4A en los macrófagos .....	39
II. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	44
Nurr1 se expresa de manera preferencial en los macrófagos con un perfil pro-inflamatorio.....	44
Cinética de expresión del mRNA de Nurr1 en respuesta a distintos PAMPs.....	44
Nurr1 parece ser un regulador negativo de la función inflamatoria de los macrófagos pro-inflamatorios .....	46
III. JUSTIFICACIÓN .....	47
IV. HIPÓTESIS.....	48
V. OBJETIVO GENERAL .....	48
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48
Objetivo 1. Determinar la expresión y regulación de Nurr1 en los M $\phi$ humanos polarizados.....	48
Objetivo 2. Determinar la contribución del receptor nuclear Nurr1 a la funcionalidad de los M $\phi$ humanos .....	48
Objetivo 3. Identificar algunos de los mecanismos de acción de Nurr1 en los M $\phi$ s humanos.....	48
VII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	49
7.1. Aislamiento de monocitos.....	49
7.2. Generación de macrófagos pro- y anti-inflamatorios.....	49

---

7.3.	Ensayos de Western blot.....	50
7.4.	Inhibición de las vías de NF- $\kappa$ B y MAPKs.....	50
7.5.	Extracción de RNA .....	51
7.6.	Análisis de expresión de transcritos por PCR cuantitativa .....	52
7.7.	Microscopía Confocal .....	53
7.8.	Detección intracelular de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) 53	
7.9.	Ensayo de fagocitosis.....	53
7.10.	Silenciamiento de Nurr1 .....	54
7.11.	Endocitosis de Lípidos oxidados.....	54
7.12.	Expresión de CD36 .....	55
7.13.	Análisis de gen reportero.....	55
7.14.	Análisis estadístico .....	55
VIII.	RESULTADOS.....	56
8.1.	Expresión diferencial de Nurr1 en los macrófagos pro- y anti-inflamatorios 56	
8.2.	La inhibición de p38 y NF- $\kappa$ B en los macrófagos humanos disminuye la expresión del mRNA de <i>NR4A2</i> en respuesta a LPS. ....	58
8.3.	El empleo de los agonistas C-DIM12 e IP7e tiende a aumentar la expresión, así como la localización nuclear de Nurr1 en los GM-M $\phi$ s.....	61
8.4.	La activación de Nurr1 no modifica de manera global el estado de polarización de los GM-M $\phi$ . ....	63
8.5.	Nurr1 en la funcionalidad de los GM-M $\phi$ s: regulador negativo de la función inflamatoria y de la producción de especies reactivas de oxígeno.....	66
8.6.	El silenciamiento de Nurr1 promueve el perfil pro-inflamatorio de los GM-M $\phi$ s 72	
8.7.	La activación de Nurr1 afecta la vía de señalización de NF- $\kappa$ B en los GM-M $\phi$ estimulados con LPS. ....	75
IX.	DISCUSIÓN .....	78
X.	CONCLUSIONES .....	83
	BIBLIOGRAFÍA.....	85

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Linaje de Fagocitos mononucleares.....	15
Figura 2. Los macrófagos tisulares realizan funciones homeostáticas. ....	18
Figura 3. Representación esquemática de los macrófagos polarizados M1 y M2.....	20
Figura 4 La familia de proteínas NF- $\kappa$ B.....	23
Figura 5 Las vías de señalización canónica y no canónica de NF- $\kappa$ B. ....	25
Figura 6 La superfamilia de receptores nucleares. ....	27
Figura 7 Actividades transcripcionales de los receptores nucleares.....	29
Figura 8 Modelos de la transrepresión mediada por GR. ....	31
Figura 9 Vías de transrepresión paralelas utilizadas por PPAR $\gamma$ y los LXRs. ....	34
Figura 10. Estructura de los receptores nucleares huérfanos NR4A. ....	37
Figura 11. Nurr1 regula la actividad de NF- $\kappa$ B para limitar la respuesta inflamatoria.....	38
Figura 12. Vías de señalización involucradas en la regulación de los receptores nucleares huérfanos NR4A y procesos celulares en los que estos receptores están involucrados.....	40
Figura 13. Papel regulatorio de Nur77 en la actividad de NF- $\kappa$ B durante la respuesta inflamatoria inducida por LPS. ....	42
Figura 14. Expresión basal de la proteína de Nurr1 en macrófagos pro- y anti-inflamatorios. ...	44
Figura 15. Cinética de expresión del mRNA de Nurr1 en respuesta a distintos PAMPs. ....	45
Figura 16. Expresión de marcadores de polarización en M $\phi$ transfectados con el siNurr1. ....	46
Figura 17. Expresión de la proteína de Nurr1 en GM-M $\phi$ s y M-M $\phi$ s. ....	57
Figura 18. Expresión basal del mRNA de Nurr1 en GM-M $\phi$ s y M-M $\phi$ s. ....	58
Figura 19. Cinética de expresión de NR4A2 en respuesta a LPS y tras la inhibición de las MAPks y NF- $\kappa$ B. ....	60
Figura 20. Inducción de Nurr1 tras el empleo de los agonistas C-DIM12 e IP7e. ....	62
Figura 21. Expresión de marcadores de la polarización en respuesta a la activación de Nurr1 con los agonistas C-DIM12 e IP7e.....	63
Figura 22. Producción de citocinas en los GM-M $\phi$ s tratados con C-DIM12 o IP7e. ....	65
Figura 23. Los agonistas de Nurr1 disminuyen la transcripción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a LPS. ....	66
Figura 24. La activación de Nurr1 atenúa la respuesta inflamatoria de los GM-M $\phi$ s.....	67
Figura 25. La activación de Nurr1 con C-DIM12 o IP7e disminuye la producción de ROS en los GM-M $\phi$ s. ....	68
Figura 26. La activación de Nurr1 no altera la capacidad fagocítica de los GM-M $\phi$ s. ....	69
Figura 27. Expresión de MSR1 y CD36 tras la activación o el silenciamiento de Nurr1.....	71
Figura 28. Captación de lípidos oxidados tras la activación de Nurr1.....	72
Figura 29. El silenciamiento de Nurr1 no altera de manera global el estado de polarización de los GM-M $\phi$ . ....	73
Figura 30. El silenciamiento de Nurr1 aumenta la expresión de factores pro-inflamatorios en los GM-M $\phi$ s en respuesta a LPS.....	74
Figura 31. La activación de Nurr1 previene la activación de la vía de NF- $\kappa$ B en células activadas con LPS. ....	76
Figura 32 La activación de Nurr1 no modifica la estabilidad de I $\kappa$ B- $\alpha$ . ....	77

**ABREVIATURAS**

Ab: anticuerpo (*antibody*)

ABC: transportadores dependientes de ATP (*ATP-binding cassette*)

Ad: Adenovirus

AF: factor activador o función de activación (*activation function*)

AP: proteína activadora (*activator protein*)

AQ: amodiaquina

Arg1: Arginasa 1

ATM: macrófagos de tejido adiposo (*Adipose tissue macrophages*)

BMDM: macrófagos derivados de médula ósea (*bone marrow-derived macrophages*)

cAMP: adenosin monofosfato cíclico (*Cyclic adenosine monophosphate*)

C-DIM12: Bis3'-(Indolyl)-1-(p-Clorofenil) Metano

cDNA: DNA complementario (*complementary DNA*)

CDP: progenitor común de células dendríticas (*common dendritic cells progenitor*)

CFSE: éster de succinimidil-carboxifluoresceína (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*)

ChiP: inmunoprecipitación de la cromatina (*chromatin immunoprecipitation*)

CMP: progenitor mieloide común (*common myeloid progenitor*)

CMV: *cytomegalovirus*

co-IP: co-inmunoprecipitación

COX: ciclooxigenasa

CQ: cloroquina

CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (*cAMP-response element binding protein*)

CsnB: cytosporon B

DBD: dominio de unión a DNA (*DNA-binding domain*)

DC: célula dendrítica (*dendritic cell*)

DNA: ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

EcR: Receptor de ecdisona (*ecdysone receptor*)

EGF: factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

ER: receptor de estrógeno (*estrogen receptor*)

FGF: factor de crecimiento fibroblástico (*fibroblast growth factors*)

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)

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

GMP: progenitor de granulocitos y macrófagos (*granulocyte and macrophage progenitor*)

GR: receptor de glucocorticoides (*glucocorticoid receptor*)

GRE: elemento de respuesta a glucocorticoides (*glucocorticoid response elements*)

GSK3: cinasa 3 de glucógeno sintasa (*glycogen synthase kinase-3*)

HAT: acetil transferasa de histonas (*histone acetyltransferase*)

HDAC: desacetilasa de histonas (*histone deacetylase*)

HLA: antígeno leucocitario humano (*human leukocyte antigen*)

HMT: metil transferasa de histonas (*histone methyltransferase*)

HODE: hidroxioctadecadienoico

HSC: célula madre hematopoyética (*haematopoietic stem cell*)

HSP: proteína de choque térmico (*heat-shock protein*)

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal (*inflammatory bowel disease*)

ICAM1: Molécula 1 de adhesión intercelular (*intercellular adhesion molecule 1*)

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina

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

IL: interleucina

IL-1Ra: antagonista del receptor de interleucina 1 (*interleukin-1 receptor antagonist*)

iNOS: sintasa inducible de óxido nítrico (*inducible nitric oxide synthase*)

IP: Inmunoprecipitado

IP7e: Isoxazolo-Pyridinone 7e

IRF: factor regulador de interferón (*interferon regulatory factor*)

ISRE: elemento de respuesta sensible a IFN (*IFN-sensitive response element*)

KO: *Knock Out*

LBD: dominio de unión a ligando (*ligand-binding domain*)

LFA1: antígeno-1 asociado a la función del linfocito (*lymphocyte function-associated antigen-1*)

LPS: lipopolisacárido bacteriano

LXR: receptores hepáticos X (*liver X receptors*)

MACS: separación magnética de células (*Magnetic Cell Sorting*)

MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)

MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1 (*Monocyte chemoattractant protein 1*)

MC1R: receptor de melanocortina 1 (*melanocortin 1 receptor*)

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor*)

MDP: progenitor de M $\phi$  y DC (*the macrophage and dendritic cell progenitor*)

M $\phi$ : macrófagos

MHC: complejo principal de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*)

MIP: proteína inflamatoria de macrófagos (*macrophage inflammatory protein*)

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

MMP: metaloproteasas de matriz (*matrix metallopeptidase*)

MR: receptor de manosa (*mannose receptor*)

mRNA: RNA mensajero (*messenger RNA*)

NBRE: elemento de respuesta a NGFI-B (*NGFI-B responsive element*)

NCoR: corepressor del receptor nuclear (*nuclear-receptor co-repressor*)

NF- $\kappa$ B: factor nuclear  $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*)

NGFI-B: *nerve-growth-factor inducible gene B*

NLK: cinasa tipo Nemo (*nemo like kinase*)

NLS: secuencia de localización nuclear (*nuclear localization sequence*)

NO: óxido nítrico (*Nitric oxide*)

NR: receptores nucleares (*nuclear receptors*)

NRA: actividad de remodelación de nucleosomas (*nucleosome remodelling activity*)

NurRE: elemento de respuesta a Nur (*Nur response element*)

OC: Osteoclastos

oxLDL: lipoproteína de baja densidad oxidada (*oxidized low-density lipoprotein*)

PBMC: células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cell*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet-derived growth factor*)

PiaS: proteína inhibitoria de STAT activado (*protein inhibitor of activated STAT*)

PI3K: fosfatidil inositol 3 cinasa (*phosphatidylinositol 3-kinase*)

PK: proteína cinasa (*protein kinase*)

POMC: proopiomelanocortina

PPAR: receptor activado por el proliferador de peroxisomas (*peroxisome-proliferator-activated receptor*)

q-PCR: PCR cuantitativa (*quantitative PCR*)

RA: artritis reumatoide (*Rheumatoid arthritis*)

RNA: ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RNI: intermediarios reactivos de nitrógeno (*reactive nitrogen intermediates*)

ROS: especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)

RXR: receptor retinoide X (*retinoid X receptor*)

SD: desviación estándar (*standard deviation*)

SFB: suero fetal bovino

siRNA: RNA pequeño de interferencia (*small interfering RNA*)

SMRT: silenciador mediador del receptor de ácido retinoico y hormona tiroidea (*silencing mediator of retinoic-acid and thyroid-hormone receptor*)

SN: sobrenadante

SR: receptor scavenger (*scavenger receptor*)

SRC-1: coactivador del receptor de esteroides 1 (*steroid receptor coactivator 1*)

STAT: traductor de señal y activador de la transcripción (*signal transducer and activator of transcription*)

SUMO: pequeño modificador similar a la ubiquitina (*small ubiquitin-like modifier*)

TF: factor de transcripción (*transcription factor*)

TGF: factor de crecimiento transformante (*transforming growth factor*)

Th: T-cooperadora (*T-helper*)

Thr: treonina (*Threonine*)

TLR: receptor tipo Toll (*Toll-like receptor*)

TNF: factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*)

Ubc: *ubiquitin-conjugating enzyme*

VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

WB: Western blot

## RESUMEN EN ESPAÑOL

Nurr1 es un miembro de la familia de receptores nucleares huérfanos NR4A que modula la respuesta inflamatoria tanto de manera positiva como de manera negativa en varios linajes celulares. Los macrófagos (M $\phi$ s) son células clave en la regulación de los procesos inflamatorios; sin embargo, el papel que Nurr1 pudiera tener en los M $\phi$ s humanos ha sido escasamente estudiado. Por esta razón, en nuestro grupo de investigación decidimos evaluar la expresión y la actividad de Nurr1 en M $\phi$ s derivados de monocitos humanos. En este estudio se cultivaron monocitos sanguíneos humanos con las citocinas hematopoyéticas GM-CSF o M-CSF, para generar M $\phi$ s con un perfil pro-inflamatorio (los tratados con GM-CSF, GM-M $\phi$ s) o con funciones anti-inflamatorias (los tratados con M-CSF, M-M $\phi$ s). En este contexto encontramos que la expresión de Nurr1 fue predominante en los GM-M $\phi$ s en comparación con los M-M $\phi$ s. Además, la transcripción de Nurr1 fue inducida tras la activación de los M $\phi$ s con ligandos de TLR-2, -3 y -4, y tanto la MAPK p38 como el factor de transcripción NF- $\kappa$ B estuvieron involucrados en la inducción de Nurr1 río abajo de TLR-4. El tratamiento de los GM-M $\phi$ s con los agonistas de Nurr1 C-DIM12 e IP7e disminuyó de manera considerable la producción de los mediadores inflamatorios TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 p40, CCL2, e IFN- $\beta$ , así como la producción de especies reactivas de oxígeno, sin afectar su capacidad de fagocitosis. El silenciamiento de Nurr1 en los GM-M $\phi$ s estimulados con LPS potenció la transcripción de *IL6*, *IFNB*, y *CCL2*, por lo que podemos considerar que éstos son genes regulados directamente por Nurr1. Mecanísticamente, la activación de Nurr1 con sus agonistas disminuyó de manera parcial la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en respuesta a LPS, así como la tasa de translocación nuclear de NF- $\kappa$ B p65. Colectivamente nuestros datos demuestran que Nurr1 se expresa preferentemente en M $\phi$ s humanos con un fenotipo inflamatorio, en los cuales limita sus respuestas inflamatorias y citotóxicas. Estas funciones de Nurr1 podrían estar relacionadas con su capacidad de inhibir la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en las células activadas con estímulos inflamatorios.

## RESUMEN EN INGLES

Nurr1 is a member of the NR4A orphan nuclear receptor family that modulates the inflammatory response in several cell lineages, both positively and negatively. Macrophages (M $\phi$ s) are key players in the regulation of inflammatory processes, however, the role that Nurr1 in human M $\phi$ s has been scarcely studied. Therefore, we decided to evaluate the expression and activity of Nurr1 in human monocyte-derived M $\phi$ s. In our study we cultured human blood monocytes with the hematopoietic cytokines GM-CSF or M-CSF, in order to generate M $\phi$  with a pro-inflammatory profile (those treated with GM-CSF, GM-M $\phi$ s) or with an anti-inflammatory phenotype (those treated with M-CSF, M-M $\phi$ s). In this context we found that Nurr1 expression was predominant in GM-M $\phi$ s when compared with M-M $\phi$ s. Nurr1 transcription was induced after activation of M $\phi$  with TLR-2, -3 and -4 ligands, and both MAPK p38 and the transcription factor NF- $\kappa$ B were involved in the induction of Nurr1 downstream of TLR-4. The treatment of GM-M $\phi$ s with the Nurr1 agonists C-DIM12 and IP7e considerably decreased the production of the inflammatory mediators TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 p40, CCL2, IFN- $\beta$ , as well as the production of reactive oxygen species, without affecting the phagocytosis ability of M $\phi$ s. In contrast, silencing of Nurr1 in LPS-activated GM-M $\phi$ s enhanced the transcription of *IL6*, *IFNB*, and *CCL2*; therefore, we consider these as *bona fide* Nurr1-responsive genes. Mechanistically, Nurr1 activation with C-DIM12 or IP7e partially decreased the transcriptional activity of the NF- $\kappa$ B pathway in cells exposed to LPS, as well as the rate of NF- $\kappa$ B p65 nuclear translocation. Collectively, our data demonstrate that Nurr1 is preferentially expressed in M $\phi$ s with pro-inflammatory attributes, where it limits their inflammatory and cytotoxic responses. This role could be associated with a reduction in the activation of the NF- $\kappa$ B pathway in cells activated with LPS.

## I. INTRODUCCIÓN

### Macrófagos

Los macrófagos (M $\phi$ s) son células heterogéneas del sistema inmune innato con una elevada plasticidad y versatilidad. Presentan una gran diversidad de funciones relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis del organismo, como la fagocitosis de células apoptóticas, cicatrización de heridas, la defensa frente a patógenos y células tumorales, así como la regulación de la función inmunitaria (1). Los M $\phi$ s, junto con los neutrófilos, trabajan en conjunto constituyendo la primera línea de defensa (inmunidad innata) contra microorganismos patógenos (2). Los neutrófilos llegan antes, pero los M $\phi$ s sobreviven durante un mayor tiempo en el sitio de infección. De esta manera, los M $\phi$ s son las células efectoras dominantes en los estados tardíos de la respuesta inmune innata.

### Origen de los macrófagos

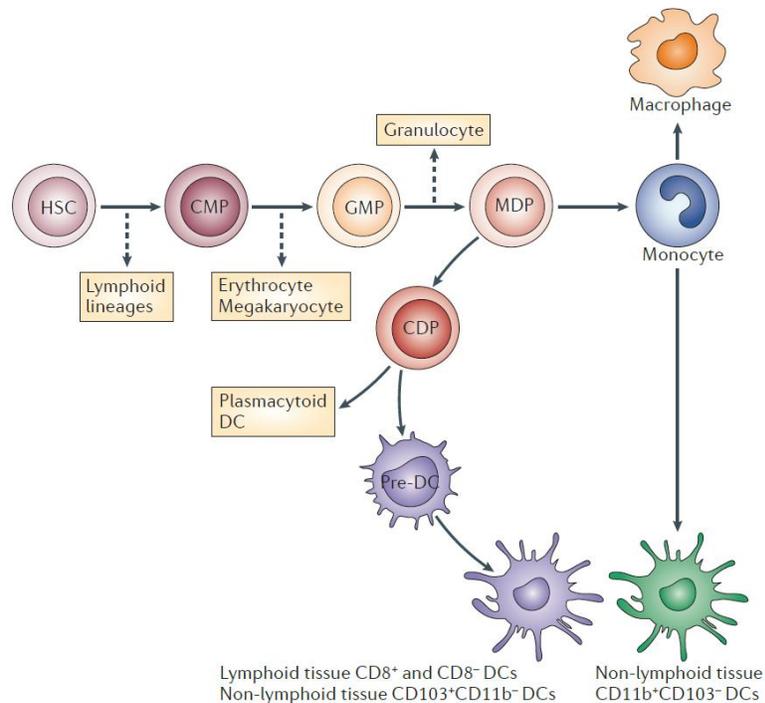
Los M $\phi$ s conforman el sistema fagocítico mononuclear junto con los monocitos y las células dendríticas (DC, *Dendritic Cell*), cuyas funciones principales son el mantenimiento de la homeostasis del organismo y la regulación de la inflamación y la respuesta inmune (3, 4).

Estas células provienen de un progenitor común en la médula ósea (MDP, *Macrophage and Dendritic cell Progenitor*), el cual da lugar a los monocitos/M $\phi$ s y al progenitor común de células dendríticas (CDP, *Common Dendritic cell Progenitor*), con un potencial de diferenciación restringido hacia células dendríticas (5, 6) (**Figura 1**).

Los monocitos humanos se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a la expresión diferencial de las moléculas de superficie CD14 y CD16: los monocitos clásicos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (Ly6C<sup>hi</sup> en ratón), también llamados inflamatorios, los cuales

expresan altos niveles de CCR2 y bajos de CX<sub>3</sub>CR1, y los monocitos CD16<sup>+</sup>, los cuales a su vez comprenden a los monocitos no clásicos CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> (Ly6C<sup>lo</sup> en ratón) y a los monocitos intermedios CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. Ambos subgrupos expresan bajos niveles de CCR2 y altos niveles CX<sub>3</sub>CR1. Los monocitos clásicos representan alrededor del 90-95% y los monocitos CD16<sup>+</sup> del 5-10% de los monocitos sanguíneos en un individuo sano (7-10).

Los monocitos se generan en la médula ósea y circulan por la sangre. Algunos pueden migrar a los tejidos, especialmente durante las reacciones inflamatorias, donde se pueden diferenciar a Mφs o células dendríticas (4). Las subpoblaciones de monocitos tienen distinta capacidad migratoria, así como potencial de diferenciación hacia diversos grupos de Mφs y células dendríticas, dependiendo del tipo de tejido y del microambiente inmunológico (11).



**Figura 1. Linaje de Fagocitos mononucleares.** El compromiso de diferenciación a monocito, macrófago o célula dendrítica (DC) ocurre en la etapa de progenitor de Mφs y DC (MDP). MDP puede dar lugar al progenitor común de células dendríticas (CDP) o a monocitos. CDP está comprometido a el linaje de DC y da lugar tanto a DC CD8<sup>+</sup> y CD8<sup>-</sup> en tejidos linfáticos y DC CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> en tejidos no linfoides. Además, los monocitos dan lugar a algunas DC CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> o Mφs. CMP, progenitor mieloide común; GMP, progenitor de granulocitos macrófagos; HSC, célula madre hematopoyética (3).

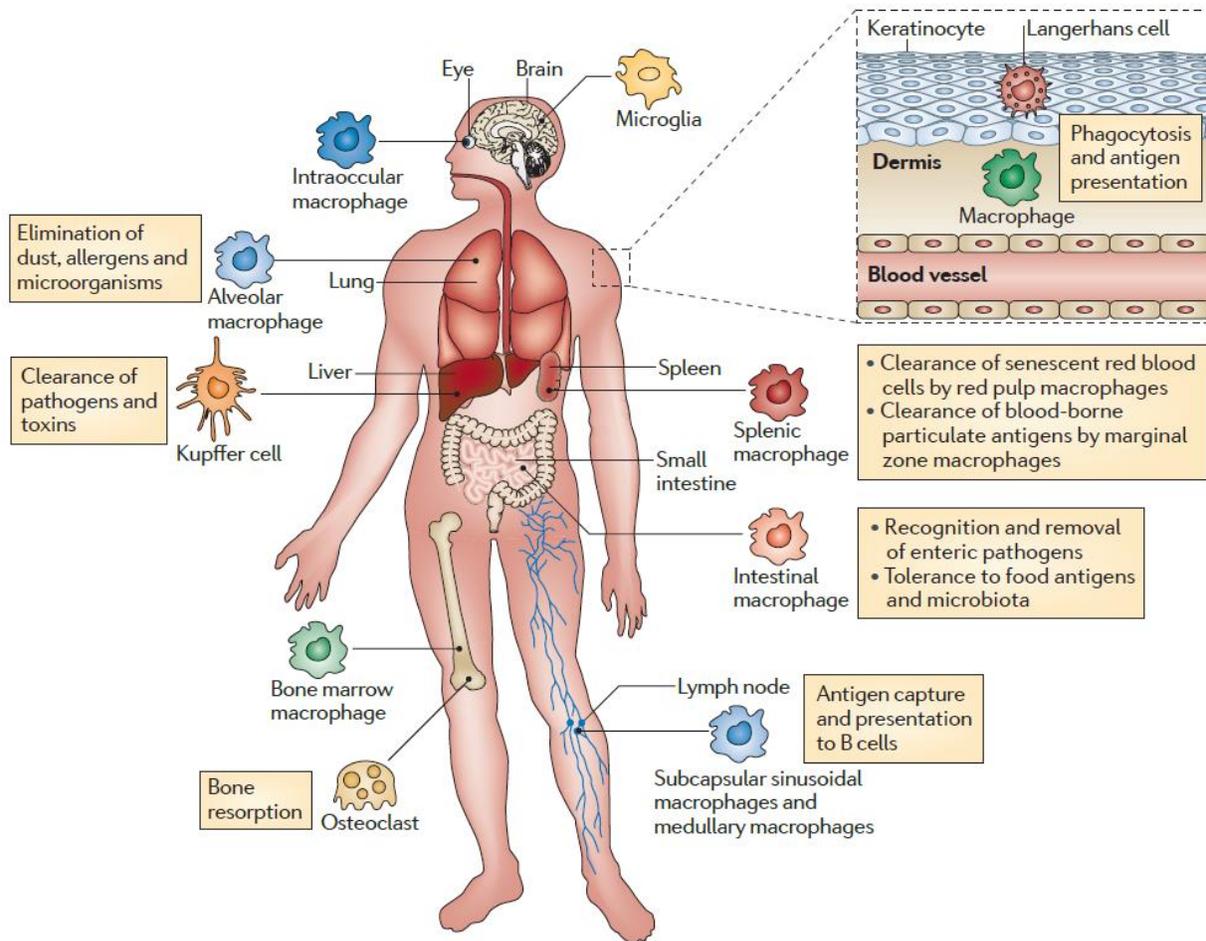
Los monocitos clásicos o inflamatorios se consideran un subgrupo menos maduro y capaz de dar lugar a M $\phi$ s con un fenotipo inflamatorio o a DCs (7, 12). Los monocitos no clásicos han sido también llamados “patrulleros” debido a que se arrastran lentamente a lo largo del endotelio (a manera de patrullaje) por la acción de la integrina LFA-1. En un modelo de ratón infectado i.p. (intra-peritonealmente) con la bacteria *L. monocytogenes* se observó que este subgrupo de monocitos era reclutado rápidamente al sitio de infección para iniciar una respuesta inmune temprana y diferenciarse a M $\phi$ s (13). Sin embargo, en modelos de ratón de daño al musculo esquelético, así como de infarto al miocardio, se ha mostrado que son los monocitos clásicos (Ly6C<sup>hi</sup>) los primeros en ser reclutados al tejido dañado y diferenciarse a M $\phi$ s. Tras un periodo agudo de inflamación se produce un cambio en el fenotipo de estos M $\phi$ s inflamatorios a M $\phi$ s con un perfil anti-inflamatorio. En estos modelos se ha sugerido que los monocitos no clásicos dan lugar a los M $\phi$ s tisulares en condiciones basales, y que durante la inflamación migran más tardíamente que los monocitos clásicos y que pueden dar lugar a M $\phi$ s con características anti-inflamatorias y reparadoras de tejido (4, 14, 15).

Los M $\phi$ s se encuentran prácticamente en todos los tejidos del cuerpo humano y son capaces de adquirir diferentes características morfológicas y fisiológicas dependiendo del tipo de tejido y de los diversos estímulos recibidos del microambiente inmunológico. Se dividen en subpoblaciones dependiendo de su localización anatómica y su funcionalidad. Por ejemplo, los osteoclastos (en el hueso), los macrófagos alveolares (en el pulmón) y las células de Kupffer (en el hígado). Cada una de estas subpoblaciones lleva a cabo funciones homeostáticas en sus respectivos tejidos (16) **(Figura 2)**.

Durante muchos años se consideró que los M $\phi$ s provenían solamente de la diferenciación de monocitos sanguíneos que se extravasaban a los tejidos; sin embargo, hallazgos en cuanto al origen primitivo y capacidad de autorrenovación de la microglía (17-19), la capacidad de expansión de los M $\phi$ s en respuestas inflamatorias del tipo 2 (20), así como recientes hallazgos en individuos con monocitopenia (reducción del

---

recuento de monocitos en sangre) severa que no tienen afectados los números de M $\phi$ s tisulares han refutado esta hipótesis (21, 22). Existe evidencia de que la mayoría de los M $\phi$ s tisulares derivan de precursores del saco vitelino o del hígado fetal durante el desarrollo embrionario, y colonizan los tejidos antes del nacimiento. Además, estos M $\phi$ s poseen capacidad de auto-renovación y se mantienen durante la vida adulta con una contribución mínima de los monocitos circulantes (23-25). Por otro lado, en un modelo de peritonitis en ratón se ha demostrado la proliferación de M $\phi$ s infiltrantes derivados de médula ósea, así como de M $\phi$ s residentes de tejido (26). Por lo tanto, cada tejido en la vida adulta tiene su propia combinación de M $\phi$ s de origen embrionario/M $\phi$ s residentes de tejido y M $\phi$  de origen monocítico/M $\phi$ s infiltrantes (27, 28). De esta manera, la gran diversidad fenotípica y funcional de los M $\phi$ s podría estar regulada por factores de transcripción maestros específicos del origen celular, así como por los inducidos por el microambiente tisular.



**Figura 2. Los macrófagos tisulares realizan funciones homeostáticas.** Los fagocitos mononucleares son generados a partir de células madre hematopoyéticas comprometidas localizadas en la médula ósea. Los precursores de los  $M\phi$ s son liberados dentro de la circulación como monocitos y rápidamente migran a casi todos los tejidos del cuerpo, donde ellos se diferencian a  $M\phi$ s maduros. Varias poblaciones de  $M\phi$ s tisulares maduros son estratégicamente localizadas a través del cuerpo y realizan actividades importantes de vigilancia inmune, incluyendo fagocitosis, presentación de antígenos y supresión inmune (16).

## Polarización M1 y M2

Tradicionalmente, los  $M\phi$ s han sido agrupados en dos clases en función de sus características funcionales,  $M\phi$ s polarizados M1 y  $M\phi$ s polarizados M2. Estos  $M\phi$ s se diferencian entre sí en la expresión de receptores de superficie celular, en la producción y secreción de citocinas y quimiocinas, así como en sus funciones fisiológicas (29).

Los M $\phi$ s M1 pueden ser generados *in vitro* mediante el cultivo de monocitos con lipopolisacárido bacteriano (LPS) y con citocinas como interferón (IFN)- $\gamma$ , o factor estimulante de colonias de granulocitos/M $\phi$ s (GM-CSF), mientras que los M $\phi$ s M2 pueden ser generados tras el cultivo con citocinas de tipo Th2 (IL-4, IL-13), así como con factores inmunosupresores como la IL-10, o el factor estimulante de colonias de M $\phi$ s (M-CSF) (30).

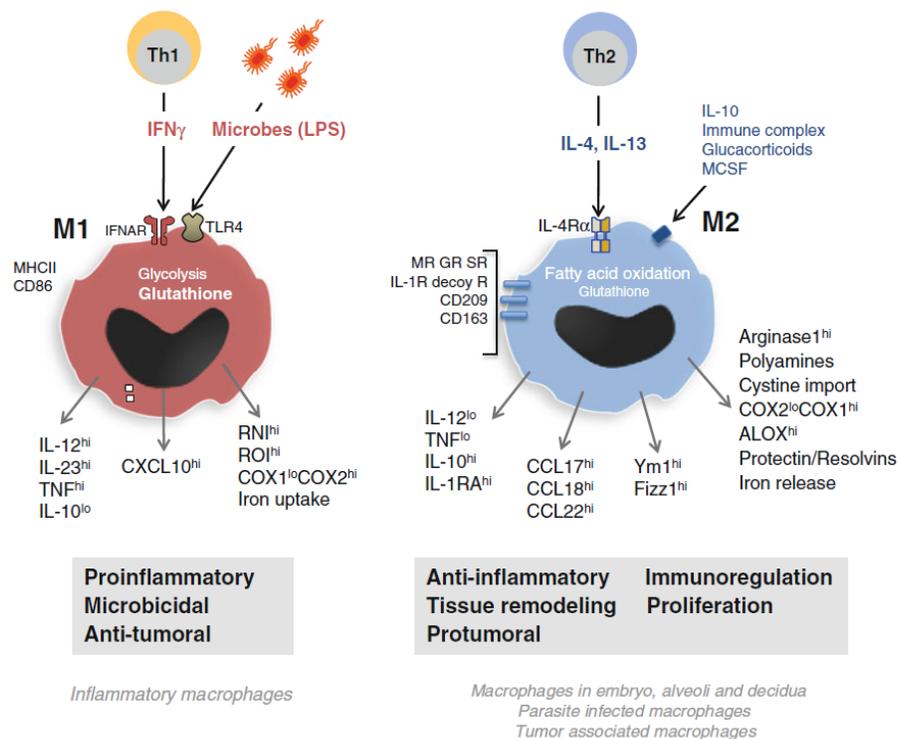
Los M $\phi$ s polarizados hacia un fenotipo M1 (clásico o pro-inflamatorio) se caracterizan por una elevada producción y secreción de citocinas inflamatorias [interleucina (IL)-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral (TNF), IL-6, IL-12 e IL-23], baja secreción de IL-10, alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNI), y por su alta capacidad microbicida y tumoricida. Los M $\phi$ s M1 están relacionados con el inicio y el mantenimiento del proceso inflamatorio, así como en el mantenimiento de las respuestas de linfocitos Th1 y Th17 y en la defensa contra patógenos intracelulares (**Figura 3**).

Los M $\phi$ s polarizados hacia un fenotipo M2 (no clásico o alternativo) secretan principalmente citocinas anti-inflamatorias (IL-10, antagonista del receptor de IL-1 -IL-1Ra-), así como diversos factores de crecimiento (PDGF, FGF, VEGF). Además, tienen una alta capacidad fagocítica y alta expresión de lectinas y receptores scavenger. Funcionalmente, los M $\phi$ s M2 están asociados con la resolución del proceso inflamatorio, la eliminación de células muertas, la remodelación y reparación del tejido, la proliferación de diversos tipos celulares (células endoteliales, fibroblastos), y la angiogénesis. Estos M $\phi$ s modulan las respuestas de linfocitos Th2, y están involucrados en la defensa frente a parásitos, la fibrosis y la progresión tumoral (31-33) (**Figura 3**).

Los M $\phi$ s tienen roles tanto protectores como patogénicos, por lo que cambios en la diferenciación, polarización, o activación de los M $\phi$ s, pueden jugar un papel decisivo en la patogénesis de una amplia variedad de enfermedades inflamatorias, metabólicas, y autoinmunes, como lo son la obesidad, la diabetes, el cáncer, la

ateroesclerosis, la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras (34-39).

La exposición de los Mφs M1 a señales M2 o viceversa puede inducir una repolarización o reprogramación de los Mφ, es decir, el fenotipo de los Mφs polarizados M1 y M2 puede en cierta medida ser revertido, tanto *in vitro* como *in vivo*, otra evidencia de su elevada plasticidad la cual puede ser utilizada con fines terapéuticos (40-42).



**Figura 3. Representación esquemática de los macrófagos polarizados M1 y M2.** Se indican las señales polarizantes, y las características moleculares, metabólicas y funcionales de estos Mφs. El texto en cursivas muestra algunos posibles ejemplos de cada tipo de Mφs polarizado *in vivo*. SR (receptor scavenger), MR (receptor de manosa), GR (receptor de glucocorticoides) (31).

## Macrófagos generados a partir de GM-CSF y M-CSF

Aunque el GM-CSF y el M-CSF inicialmente fueron definidos como factores de crecimiento hematopoyéticos, se ha demostrado que tienen un rol más amplio en la regulación de la respuesta inmune.

El M-CSF es detectable en condiciones normales en plasma y varios tejidos del cuerpo humano y es producido por múltiples tipos celulares, incluyendo fibroblastos, células endoteliales, células estromales, células de músculo liso, M $\phi$ s y osteoclastos. En contraste el GM-CSF es producido principalmente en zonas de inflamación por leucocitos activados en respuesta a la infección o daño tisular.

Aunque muchas poblaciones de células mieloides, así como de células pertenecientes a otros linajes (células endoteliales, células epiteliales, células de músculo liso, fibroblastos, queratinocitos y neuronas) cuentan con los receptores y son capaces de responder al GM-CSF y M-CSF, son los M $\phi$ s el principal blanco de estos factores (43, 44).

Tanto el GM-CSF como el M-CSF promueven la sobrevivencia y la proliferación de los M $\phi$ s. La señalización a través del receptor de M-CSF es importante para el mantenimiento y supervivencia de los monocitos no clásicos, así como en el control del desarrollo de varias poblaciones de M $\phi$ s en todo el organismo, y está relacionada con la resolución del proceso inflamatorio y la homeostasis. Por el contrario, el GM-CSF puede contribuir a prolongar la respuesta inflamatoria mediante la amplificación de la supervivencia y la activación de los M $\phi$ s así como contribuyendo a la extravasación de monocitos clásicos y de neutrófilos (44-46).

Las poblaciones de M $\phi$ s producidas mediante el cultivo de monocitos con GM-CSF y M-CSF han sido categorizadas como pertenecientes a los fenotipos M1 y M2, respectivamente. Los M $\phi$ s generados con GM-CSF (GM-M $\phi$ s) promueven la inmunidad de tipo 1 y secretan IL-23, IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6 y TNF. Los M $\phi$ s generados con M-CSF (M-M $\phi$ s) secretan principalmente IL-10, IL-8, y CCL2, expresan receptores scavenger como CD163 y CD163L1, lectinas como CLEC5A, CD206, o CD209, y estimulan la polarización Th2. Además, los M-M $\phi$ s muestran una baja capacidad de

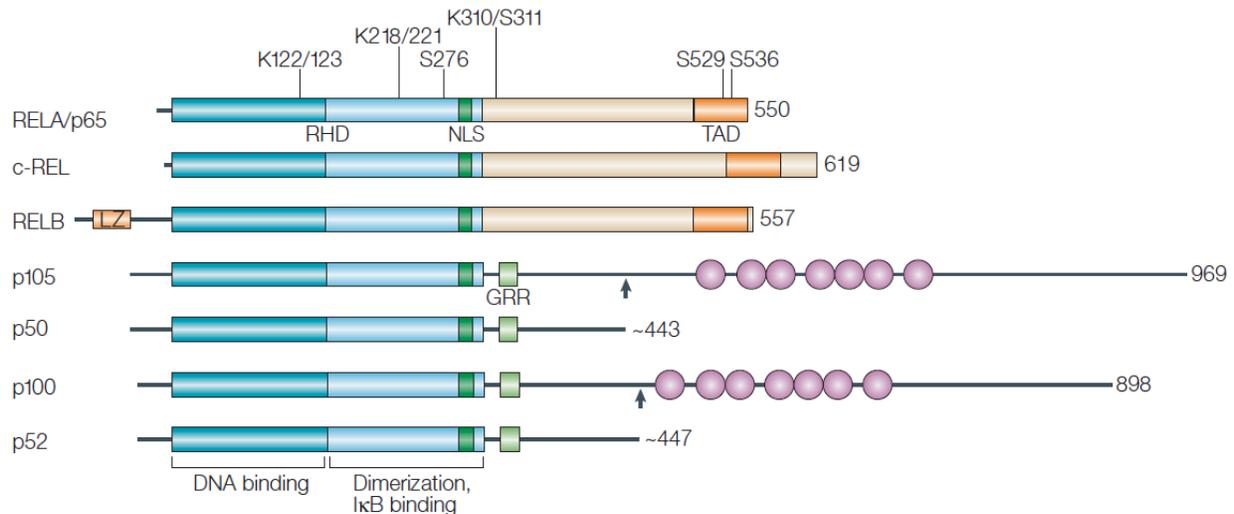
presentación de antígenos, así como una regulación a la baja de la expresión de moléculas coestimuladoras como HLA-DR, CD86 y CD40 tras la activación con LPS, lo cual no se observa en los GM-Mφs, los cuales incluso presentan una sobreexpresión de estas moléculas tras la activación. Ambos tipos de Mφs expresan niveles similares de los receptores tipo Toll (TLR)-2 y -4, aunque el TLR-7 se expresa preferentemente en los M-Mφs (47, 48).

El perfil transcripcional de ambas poblaciones de Mφs está regido por la activación de diversos factores de transcripción. El estímulo con GM-CSF induce la activación de los factores de transcripción STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*), IRF5 (*interferon regulatory factor 5*) e IRF4 y se ha mostrado que estos factores de transcripción son importantes en el establecimiento del perfil inflamatorio (49-51), mientras que el estímulo con M-CSF induce la activación de STAT1, STAT3 e IRF5 (50, 52, 53). Por otro lado, el factor de transcripción NF-κB (*nuclear factor κB*) participa en la adquisición de ambos fenotipos (51, 54).

Por todo lo anterior se ha propuesto que los GM-Mφs tienen un papel en el mantenimiento y prolongación de la respuesta inflamatoria mientras que los M-Mφs pueden tener un papel en el mantenimiento de la homeostasis y en la resolución de la inflamación.

### **La vía de señalización de NF-κB**

La familia de factores de transcripción NF-κB consta de 5 miembros, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 y p100/p52, los cuales comparten un dominio de homología Rel (RHD; Rel homology domain) en su extremo amino terminal (55, 56). (**Figura 4**). Esta familia de factores de transcripción desempeña un papel esencial en múltiples procesos tanto fisiológicos como patológicos.



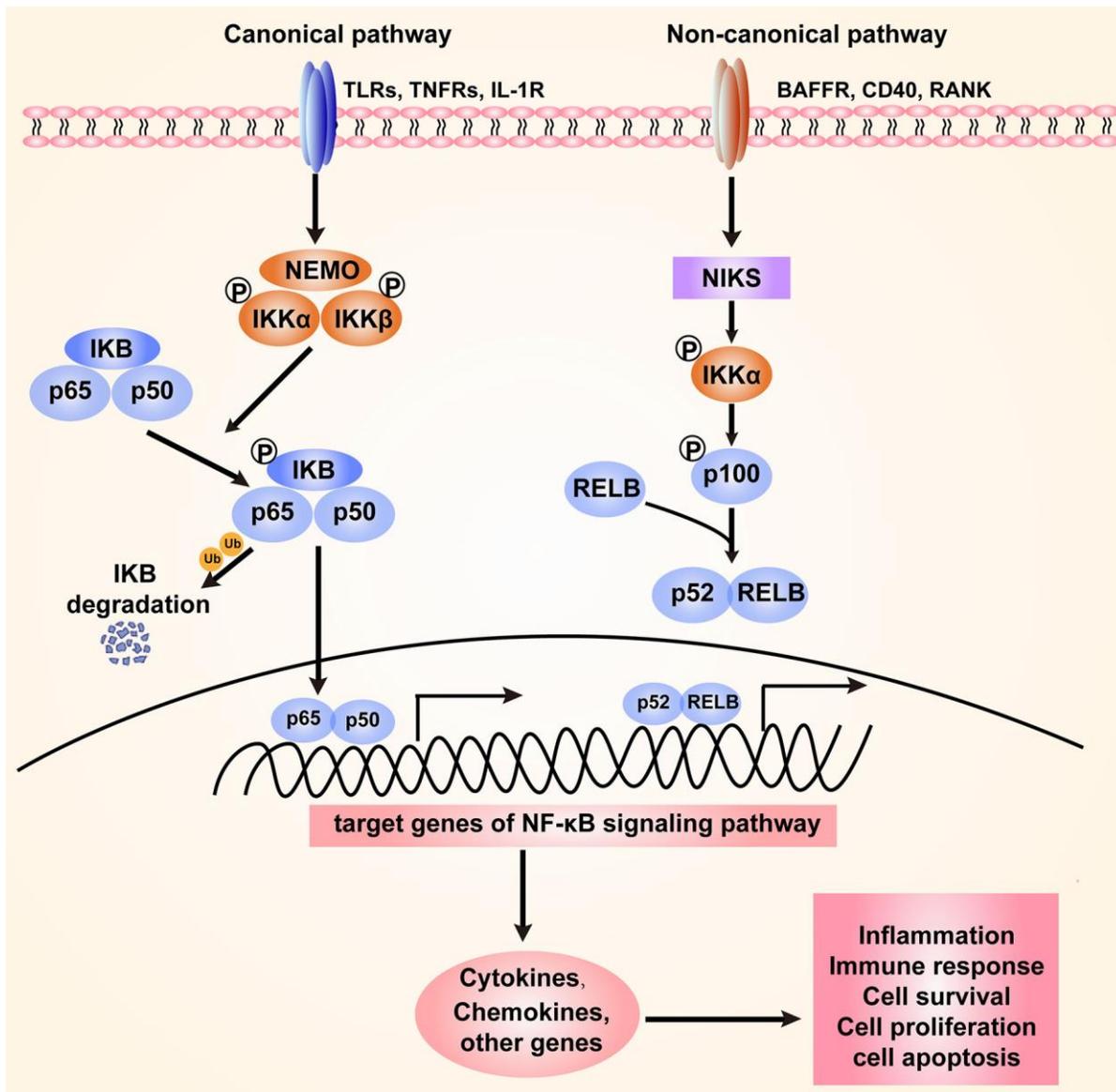
**Figura 4 La familia de proteínas NF-κB.** RELA/p65, c-REL, RELB, p105, p50, p100 y p52 — contienen dominios de homología REL (RHD). La porción carboxi-terminal del RHD media la dimerización con otros miembros de la familia NF-κB/REL y forma el sitio para el acoplamiento físico a las proteínas IκBs. Solo RELA, c-REL y RELB contienen dominios de transactivación carboxi-terminal (TADs). Las proteínas p105 y p100 contienen repeticiones de anquirina (indicadas por círculos rosas), así como regiones ricas en glicina (GRR). Las GRR son importantes para el procesamiento de p105 a p50 y de p100 a p52. La fosforilación de RELA en las serinas (S)276, S311, S529 y/o S536 es necesaria para una actividad transcripcional óptima de NF-κB. La acetilación de RELA en las lisinas (K)122, K123, K218, K221 y K310 regula distintas funciones de NF-κB, incluida la unión al ADN, la asociación IκBα y la transactivación mediada por RELA. La cremallera de leucina (LZ; leucine zipper) de RELB es necesaria para la transactivación por RELB (55).

Existen dos vías de señalización de NF-κB, la vía canónica y la vía no canónica (**Figura 5**) (57-59). El paso crucial en la activación de la vía canónica es la activación dependiente de la fosforilación de las proteínas IκB (*inhibitor of NF-κB*) mediada por las proteínas cinasas de IκB (IKKs) (56, 60-63). Dicha fosforilación lleva a la ubiquitinación y posterior degradación de las IκBs, resultando en la liberación de los heterodímeros p50-p65 y su translocación al núcleo para dirigir la transcripción génica (55, 56, 64, 65).

En los Mφs la vía canónica es rápidamente activada a través de los receptores de patrones de reconocimiento (PPRs), que reconocen diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o asociados a daño (DAMPs), para inducir la expresión de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias que coadyuvan en la eliminación de los patógenos y, posteriormente, en la reparación del tejido (66-68). Algunas de estas

citocinas proinflamatorias, como TNF e IL-1 $\beta$ , también son capaces de activar la vía canónica de NF- $\kappa$ B mediante la unión a sus receptores TNFR1 e IL-1R1, respectivamente. La activación de la vía canónica de NF- $\kappa$ B es rápida pero transitoria, ya que esta vía también induce la expresión de reguladores negativos como I $\kappa$ B $\alpha$ , A20 y p105 (55, 69, 70). La actividad prolongada de esta vía de señalización puede llevar a enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), esclerosis múltiple, o aterosclerosis (71).

Por otro lado, la vía no canónica de NF- $\kappa$ B es activada solamente a través de una serie de receptores pertenecientes a la superfamilia del TNF (58, 59, 72). Tras la activación, la cinasa clave en esta vía NIK (NF- $\kappa$ B *inducing kinase*) fosforila y activa a IKK $\alpha$ . Esta cinasa fosforila a la subunidad p100, la proteína precursora de p52, la cual funciona como una proteína tipo I $\kappa$ B bloqueando la translocación de RelB al núcleo. El procesamiento proteolítico de p100 resulta en la liberación del heterodímero p52-RelB para su translocación al núcleo y la regulación de la transcripción (73, 74). Se ha reportado la participación de la vía no canónica de NF- $\kappa$ B en el desarrollo de órganos linfoides, así como en enfermedades inflamatorias crónicas (59, 75-77).



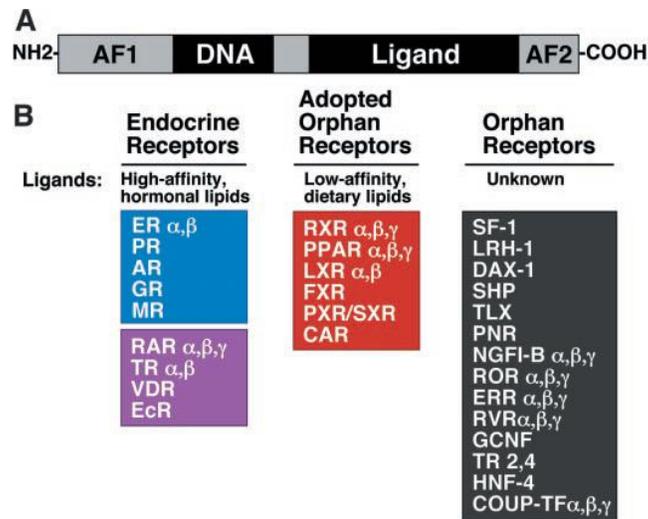
**Figura 5 Las vías de señalización canónica y no canónica de NF- $\kappa$ B.** La vía canónica es inducida por TLRs, TNFRs, e IL-1R. La activación de esta vía lleva a la fosforilación y degradación de la proteína inhibitoria I $\kappa$ B. El heterodímero p65-p50 es liberado y translocado al núcleo. La vía no canónica se activa por miembros de la superfamilia de receptores de TNF, como el receptor del factor activador de células B (BAFFR; *B-cell activating factor receptor*), CD40, o por el receptor activador de NF- $\kappa$ B (RANK). Su activación induce la fosforilación de NIK, la cual subsecuentemente fosforila IKK $\alpha$ . Posteriormente el heterodímero p52-RelB es activado y traslocado al núcleo. La activación de la vía de NF- $\kappa$ B regula varios procesos celulares a través de la regulación de la expresión de diversas citocinas, quimiocinas y otros genes (78).

## Los receptores nucleares y sus mecanismos de acción

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 (79).

Los NR están formados por 5 ó 6 dominios (designados en regiones de la A a la F, del extremo N-terminal al extremo C-terminal): un dominio de activación transcripcional altamente variable (AF-1; *activation function 1*) o región A/B en su extremo amino terminal; un dominio de unión a DNA altamente conservado (DBD; región C), el cual media la unión a los elementos de respuesta del DNA; un dominio de bisagra o región D que le da flexibilidad a la proteína, que está involucrado en los cambios conformacionales y que contiene una secuencia de localización nuclear (NLS); una región E en el extremo carboxilo terminal, con un segundo dominio de activación transcripcional (AF-2) dependiente de ligando y un dominio de unión a ligando (LBD) el cual, además de determinar la especificidad de ligando para cada receptor, está involucrado en otras funciones como la formación de homodímeros o heterodímeros, la localización subcelular, y la activación o represión transcripcional dependiente del ligando. Algunos receptores además presentan una región F en su extremo amino terminal cuya función es pobremente entendida, pero se cree está relacionada con la modulación de su actividad (80, 81). (**Figura 6A**).

Los NR pueden dividirse en tres subgrupos principales dependiendo del tipo y fuente de ligando: i) los receptores endocrinos, que incluyen el receptor de glucocorticoides (GR) y el receptor de estrógenos (ER), ii) los receptores huérfanos, para los cuales no se han encontrado ligandos naturales y en algunos casos pueden funcionar de manera independiente de ligando, y iii) los receptores huérfanos "adoptados", que funcionan como heterodímeros con el receptor de retinoide X (RXR) y responden a lípidos provenientes de la dieta. Estos últimos fueron descritos inicialmente como receptores huérfanos y posteriormente se descubrieron sus ligandos y se determinaron sus roles fisiológicos [ej., los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs) o los receptores hepáticos X (LXR)] (79) (**Figura 6B**).



**Figura 6 La superfamilia de receptores nucleares.** (A) Estructura esquemática de un típico receptor nuclear. (B) Los receptores nucleares pueden subdividirse en tres o cuatro grupos dependiendo de la fuente y el tipo de ligando. Los receptores con ligandos fisiológicos conocidos son mostrados en color, y los actuales receptores huérfanos son mostrados en gris. En la lista de receptores nucleares huérfanos se incluyen proteínas (ej. ERRs, HNF-4) que se ha demostrado que unen compuestos en condiciones no fisiológicas. Los receptores mostrados incluyen los 48 receptores humanos y el receptor de insecto EcR (ecdysone receptor), que es el único receptor nuclear de invertebrados con un ligando conocido (79).

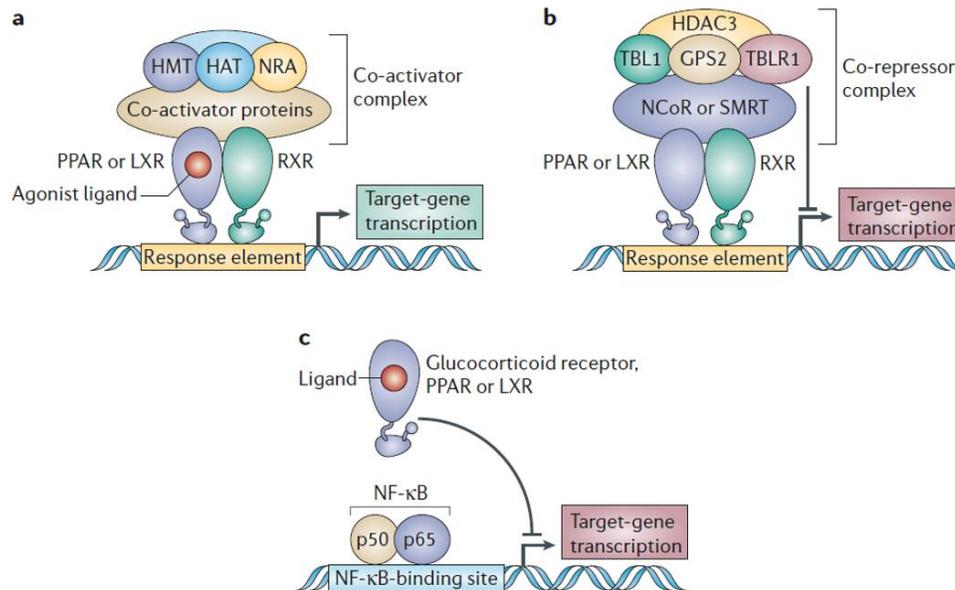
A pesar de que los NR son conocidos por sus actividades clásicas (funciones genómicas) como TF, para algunos de ellos han sido descritas funciones no genómicas, fuera del núcleo celular, participando como mediadores de diversas vías de señalización (80, 81). Las acciones de los NR están moduladas por varios mecanismos endógenos que incluyen: 1) unión al ligando, 2) modificaciones postraduccionales, 3) dimerización de proteínas, 4) transferencia nuclear, 5) interacciones proteína-proteína con co-activadores y co-represores 6) unión cooperativa de DNA con otros factores de transcripción (82, 83). Los receptores nucleares pueden actuar como monómeros, homodímeros o heterodímeros y regular la transcripción de sus genes blanco por distintos mecanismos, incluyendo activación transcripcional dependiente de ligando, represión independiente de ligando, y transrepresión dependiente de ligando. No todos los receptores nucleares presentan este rango de actividades transcripcionales y sus efectos varían de manera específica de célula a célula (83, 84) (**Figura 7**).

La activación dependiente de ligando es el mecanismo prototípico de los NR, y consiste en la activación transcripcional debida a la unión directa al DNA del NR activado por ligando en la región promotora de los genes blanco, y está ligada al reclutamiento de complejos co-activadores que modifican la estructura de la cromatina y facilitan el ensamble de la maquinaria basal de transcripción en el promotor (85, 86).

Varios receptores nucleares, incluyendo los PPARs y LXRs, reprimen activamente la transcripción de sus genes blanco como heterodímeros con RXRs de manera independiente del ligando (84). Esta represión activa es ligada al reclutamiento de complejos formados por moléculas co-represoras nucleares tales como NCoR (*nuclear-receptor co-repressor*) y SMRT (*silencing mediator of retinoic-acid and thyroid-hormone receptors*). Además de este papel como co-represores nucleares de NCoR y SMRT, se ha encontrado que interactúan con otros factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B y AP-1 en la región promotora de genes específicos, manteniendo estos genes en un estado reprimido en ausencia de una señal activadora (87-89).

La transrepresión dependiente de ligando consiste en la inhibición de la actividad de otros factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B y AP-1 (los cuales son de particular interés debido a su papel como reguladores clave de las vías de señalización inflamatorias) sin la necesidad de la unión directa del NR al DNA (83, 90).

La presencia de sitios de unión a ligando distintivos, ha hecho de los NR objetivos atractivos para el desarrollo de terapias farmacológicas (91).



**Figura 7 Actividades transcripcionales de los receptores nucleares.** Miembros de la superfamilia de receptores nucleares pueden regular la transcripción tanto positivamente como negativamente por múltiples mecanismos. **(A) Activación transcripcional dependiente de ligando.** Involucra la unión del DBD a elementos de respuesta específicos en los genes blanco. La unión del ligando lleva al reclutamiento de complejos co-activadores que contienen actividades enzimáticas requeridas para el remodelamiento de la cromatina, modificaciones específicas de histonas y reclutamiento de la RNA polimerasa II, por ejemplo actividad de remodelación de nucleosomas (NRA, nucleosome remodelling activity), actividad de acetil transferasa de histonas (HAT, histone acetyltransferase) y actividad de metil transferasa de histonas (HMT, histone methyltransferase). **(B) represión activa independiente de ligando.** Muchos receptores nucleares heterodimericos, incluyendo los LXRs y PPARs son capaces de unirse a elementos de respuesta en ausencia de ligando, y de reclutar complejos co-represores que median la represión activa. Un complejo co-represor, bien definido contiene al co-represor del receptor nuclear (NCoR, nuclear-receptor co-repressor) o al silenciador mediador del receptor de ácido retinoico y hormona tiroidea (SMRT, silencing mediator of retinoic-acid and thyroid-hormone receptor), la desacetilasa de histona 3 (HDAC3, histone deacetylase 3) TBL1 (transducin-β-like 1), TBLR1 (TBL1-like related protein 1), y GPS2 (G-protein-pathway supressor). Este complejo antagoniza las acciones de los co-activadores y mantiene los genes en un estado reprimido en ausencia de ligando. **(C) transrepresión dependiente de ligando.** Muchos receptores nucleares, incluyendo el GR, los LXRs y los PPARs, reprimen la transcripción en una manera dependiente de ligando, antagonizando las acciones de otros factores de transcripción dependientes de señal, tales como NF-κB (84).

## Receptores nucleares como reguladores de la función de los macrófagos

Está bien documentado que varios receptores nucleares incluyendo el GR, los PPARs y los LXRs son reguladores clave del metabolismo de lípidos y de la inflamación en los Mφs (92-94).

Se ha reportado que la mayoría de los genes inflamatorios regulados negativamente por este grupo de receptores no cuentan con elementos de respuesta que permitan la unión directa del NR al DNA, por lo que se cree que la mayor parte de estos genes estarían siendo regulados mediante mecanismos de transrepresión (90).

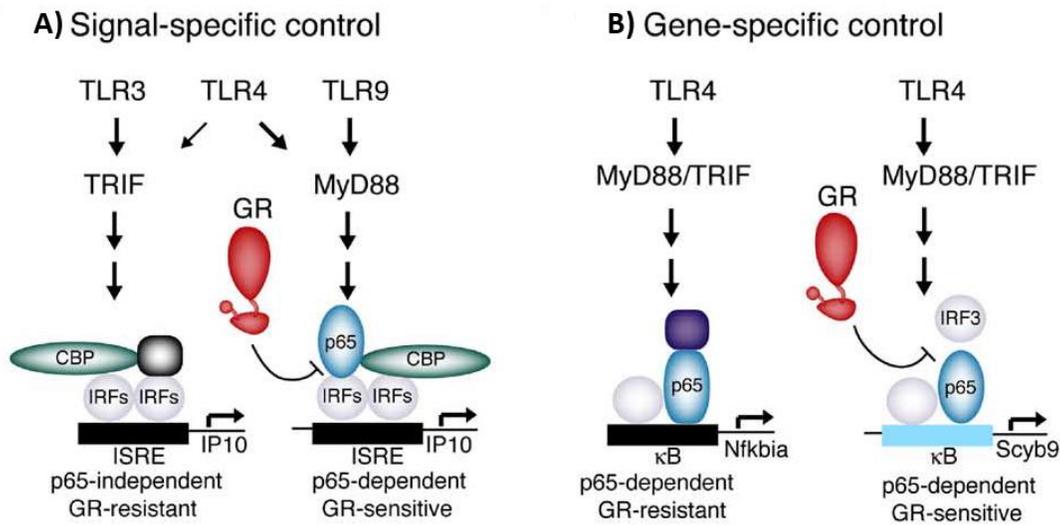
### *Receptor de glucocorticoides (GR)*

El receptor de glucocorticoides (GR) forma parte de los receptores esteroideos, los cuales son sintetizados en formas inactivas que están asociadas con complejos de proteína de choque térmico (HSP). El LBD media las interacciones de estos receptores sin ligando con complejos HSP, facilita el plegamiento correcto del receptor y previene su unión al DNA en ausencia de ligando. La unión del ligando resulta en la disociación del receptor del complejo HSP, la unión al DNA y la actividad transcripcional (95) Los glucocorticoides endógenos son liberados en respuesta al dolor, trauma o infección y la activación del GR ha demostrado tener potentes efectos inhibitorios sobre la respuesta inflamatoria (94).

El empleo de agonistas del GR ha demostrado antagonizar las acciones transcripcionales de varios mediadores pro-inflamatorios en diversos tipos celulares, incluyendo los Mφs, de manera dependiente de ligando, pero independiente de la unión al DNA. Dentro de estos genes inflamatorios reprimidos por la actividad del GR se encuentran los que codifican para el GM-CSF, TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, iNOS, y COX2 (96-101). Debido a que la mayoría de los promotores de estos genes no cuentan con elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE, *glucocorticoid response elements*), se sugiere que la mayoría son regulados mediante mecanismos de transrepresión, que involucran la unión directa a miembros de la familia de NF-κB y AP-1, la inhibición del reclutamiento de moléculas co-activadoras como PTEFβ, GRIP1 y NTRIP6, así como la

inhibición de la actividad de acetil transferasas de histonas (HATs) y el reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDACs) (90, 91, 94).

Existen dos mecanismos bien descritos que involucran el impedimento de la formación de complejos NF- $\kappa$ B p65-IRF (factores reguladores de IFN), lo cual resulta en la inhibición de un gran grupo de genes pro-inflamatorios en los M $\phi$ s. Estos mecanismos han mostrado ser dependientes de la señalización a través MyD88 y además ser específicos de ciertos genes (102) (**Figura 8**).



**Figura 8 Modelos de la transrepresión mediada por GR. (A) Modelo específico de señal:** p65 funciona como un co-activador de los IRF. La activación mediada por IRF de genes que contengan elementos de respuesta a IRF (ISRE) por TLR-4 y TLR-9 a través de MyD88, requiere que p65 funcione como un co-activador específico de señal. La interrupción de la interacción p65/IRF por el GR activado por ligando, resulta en la transrepresión de estos genes. La activación específica de IRF3 a través de la señalización TLR3/TRIF, es independiente de p65 y por lo tanto resistente al GR. **(B) Modelo específico de gen:** IRF3 funciona como un co-activador obligado de NF- $\kappa$ B. La interrupción de la interacción IRF3/p65 por el GR activado por ligando provee una explicación para la inhibición específica de promotor de la respuesta a LPS (102).

## *PPARs*

Los PPARs y LXRs se unen al DNA como heterodímeros con RXR (79). Estos heterodímeros pueden unirse a los genes blanco tanto en ausencia como en presencia del ligando. Generalmente se encuentran unidos a los elementos de respuesta del DNA y a moléculas co-represoras como NCoR y SMRT de manera independiente de ligando, funcionando como represores transcripcionales (84).

Los PPARs funcionan como sensores y reguladores transcripcionales del metabolismo de lípidos. Los cuatro miembros de la familia PPAR (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$ , y PPAR $\delta$ ) pueden ser activados por ácidos grasos poli-insaturados, eicosanoides y varios ligandos sintéticos (103-106). Dos de los componentes de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL), ácido 9-hidroxi-octadecadienoico (9-HODE) y 13-HODE han sido identificados como activadores de PPAR $\gamma$  y tal activación potencia la expresión del receptor scavenger CD36, promoviendo de esta manera la captación de oxLDL por parte de los M $\phi$  y su subsecuente diferenciación a células espumosas, las cuales son características de la aterosclerosis (107, 108). A pesar de esto, el heterodímero PPAR $\gamma$ -RXR ha demostrado tener un papel anti-aterogénico al ser capaz de inducir la expresión de la enzima mitocondrial CYP27, resultando en el incremento de la producción de 27-hidroxicolesterol en M $\phi$ s, el cual activa a LXR y potencia el eflujo de colesterol en los M $\phi$ s, a través de miembros de la familia de proteínas transportadoras ABC (ABC, ATP-binding cassette) (109).

Los PPARs se expresan en los monocitos, M $\phi$ s, y otras células involucradas en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria, y pueden modular el desarrollo de estas respuestas mediante la regulación transcripcional en estas células en una manera dependiente de ligando (110-113). Los PPARs pueden inhibir la expresión génica inflamatoria por múltiples mecanismos incluyendo: i) la formación de complejos con NF- $\kappa$ B p65, aumentando su exportación nuclear, ii) la modulación de la actividad de la MAPK p38, iii) la formación de complejos directamente con miembros de las familias AP-1 y NF- $\kappa$ B e inhibiendo la remoción de complejos NCoR de la región promotora de sus genes

blanco (112, 114-117). Un mecanismo de transrepresión dependiente de ligando de genes de la respuesta inflamatoria bien identificado en los M $\phi$ s consiste en la sumoilación del LBD de PPAR $\gamma$ , lo que lleva a la unión de este receptor con complejos co-represores, impidiendo así su remoción de la región promotora de los genes blanco y su posterior degradación (90, 116, 118, 119) (**Figura 9**).

Además, los PPARs han demostrado ser reguladores críticos del fenotipo de los M $\phi$ , siendo capaces de dirigir la polarización de M $\phi$ s de las lesiones ateroscleróticas, M $\phi$ s de tejido adiposo (ATM), y células de Kupffer, hacia un fenotipo M2. De esta manera se ha sugerido a los PPARs como posibles blancos terapéuticos para disminuir la expresión de mediadores inflamatorios, así como la resistencia a la insulina (120-123).

### *LXRs*

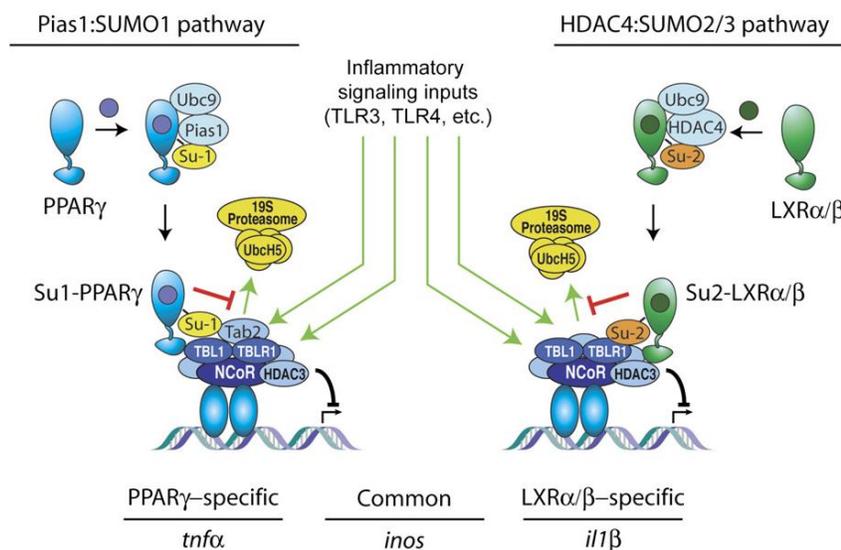
Los LXRs se describieron inicialmente como receptores nucleares que funcionan regulando la homeostasis del colesterol y pueden ser activados por oxisteroles específicos como el 24S-hidroxicolesterol y el 22R-hidroxicolesterol (124-127).

A medida que los niveles de colesterol celular aumentan se generan oxisteroles endógenos que llevan a la activación dependiente de los LXRs de las vías de eflujo de colesterol y restauración de los niveles apropiados de colesterol celular (93, 94).

Los LXRs podrían tener un papel importante en regular la homeostasis del colesterol en los M $\phi$ s tras la fagocitosis de células apoptóticas. Estudios en modelos de aterosclerosis en ratón indican que el tratamiento con agonistas sintéticos de los LXRs inhibe el desarrollo de la lesión, mientras que la pérdida de la expresión de LXR en los M $\phi$ s resulta en el desarrollo de una aterosclerosis acelerada (128, 129).

Además, los LXRs han sido caracterizados como reguladores de las vías inflamatorias en los M $\phi$ s. Ratones que no expresan LXRs muestran una exagerada respuesta al LPS, mientras que el empleo de agonistas sintéticos del LXR tales como GW3965 y T1317 inhiben la respuesta de los M $\phi$ s a patógenos bacterianos y antagonizan la inducción de un gran número de genes inflamatorios. Dentro de éstos se incluyen los genes que codifican para IL-1 $\beta$ , IL-6, MMP9, iNOS, COX2, CCL2, CCL3, CCL7 y CXCL10 (130, 131).

El mecanismo molecular responsable de la represión de estos genes de la respuesta inflamatoria por los LXRs, al igual que el mecanismo antes descrito para PPAR $\gamma$ , involucra una sumoilación dependiente de ligando, que conlleva a la unión directa del NR sumoilado (en este caso del LXR) con complejos co-represores y a la inhibición de la degradación de estos complejos, impidiendo de esta manera la actividad de los factores que inducen la transcripción de estos genes, como NF- $\kappa$ B (90, 118) (**Figura 9**).



**Figura 9 Vías de transrepresión paralelas utilizadas por PPAR $\gamma$  y los LXRs.** En ausencia de un estímulo de los TLRs un complejo co-represor conteniendo NCoR y otras subunidades está presente en la región promotora de muchos genes de la respuesta inflamatoria y activamente reprime la transcripción. Tras la activación de un TLR con un agonista, se activa la vía de señalización intracelular, llevando a la ubiquitinación del complejo co-represor y a su posterior degradación por el proteosoma 19S. **Pias1:SUMO1 pathway** La unión de PPAR $\gamma$  a su ligando induce la sumoilación de una fracción del PPAR $\gamma$  celular con Su-1 (SUMO1, small ubiquitin-like modifier 1). Esta es dependiente de Ubc9 (ubiquitin-conjugating enzyme 9) y Pias1 (protein inhibitor of activated STAT1) como ligasas SUMO E2 y E3 respectivamente. PPAR $\gamma$  sumoilado interactúa con el complejo co-represor para prevenir el reclutamiento de la enzima Ubch5 y el proteosoma 19S, componentes requeridos para la remoción del complejo co-represor de la región promotora de los genes blancos. **HDAC4:SUMO2/3 pathway** La del LXR con su ligando induce la sumoilación de una fracción del LXR celular con Su-2 o Su-3, dependiente de Ubc9 y HDAC4 como ligasas SUMO E2 y SUMO E3 respectivamente. Los LXRs sumoilados también interactúan con el complejo co-represor para prevenir el reclutamiento dependiente de señal de Ubch5 y del proteosoma 19S, componentes requeridos para la remoción del complejo co-represor de la región promotora de los genes blancos (118).

Además de regular la homeostasis del colesterol y la respuesta inflamatoria, se ha descrito que los LXR son capaces de inhibir la apoptosis de los M $\phi$ s inducida por los patógenos, esto mediante la inducción de la expresión de factores anti-apoptóticos y la disminución de factores pro-apoptóticos (132, 133). De manera inversa, ratones carentes de LXRs mostraron ser altamente susceptibles a la infección con la bacteria intracelular *L. monocitogenes*. Los M $\phi$ s de estos animales mostraron una apoptosis acelerada después de la infección y una reducida capacidad para eliminar bacterias (132). Otro factor que podría estar contribuyendo a la susceptibilidad bacteriana presentada por estos ratones es la ausencia de macrófagos de la zona marginal del bazo, ya que se ha reportado que la diferenciación de este subgrupo de macrófagos esta mediada por la actividad del LXR $\alpha$  (134).

Por todo lo anterior, el uso de agonistas de estos receptores ha sido empleado en el tratamiento de varias enfermedades inflamatorias en las que los M $\phi$ s juegan un papel central como la aterosclerosis, la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal, etc.

El papel de los NR huérfanos en la funcionalidad de los M $\phi$ s ha sido muy poco estudiado. De ellos, 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 (135). La modulación de la actividad de los NR4A ha demostrado ser beneficiosa en modelos animales de diabetes (136) y de aterosclerosis (137).

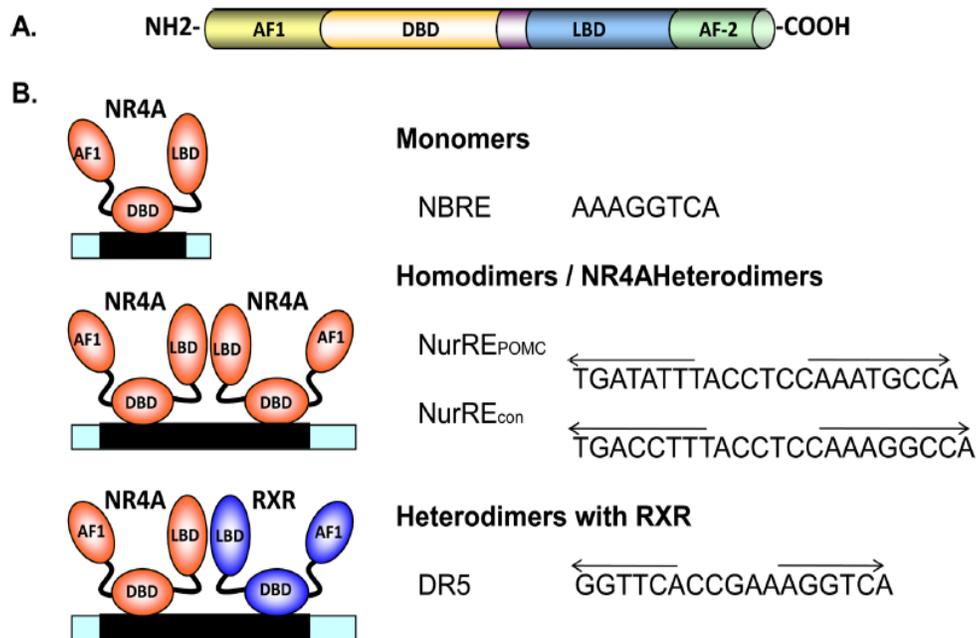
### **Familia de receptores nucleares huérfanos NR4A**

La familia de receptores nucleares NR4A está compuesta por tres miembros: Nur77 (NR4A1), Nurr1 (NR4A2) y NOR-1 (NR4A3) (80, 138-140). 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 (141). También se ha demostrado su expresión en células del sistema inmunitario, y han sido especialmente estudiados en los linfocitos T, células dendríticas, y M $\phi$ s (142-145).

Los receptores NR4A presentan la estructura típica de un NR. Contienen un dominio de transactivación independiente de ligando en la región N-terminal (AF-1), un dominio central DBD altamente conservado formado por dos dedos de zinc, y un dominio LBD que a su vez contiene un dominio de transactivación dependiente de ligando en su extremo C-terminal (AF-2) (146) **(Figura 10A)**. 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. 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, el octaquétido cytosporone B (CsnB), el 1,1-Bis3'-(Indolyl)-1-(p-Clorofenil) Metano (C-DIM12), el Isoxazolo-Pyridinone 7e (IP7e) la cloroquina (CQ) y la amodiaquina (AQ) (147-151).

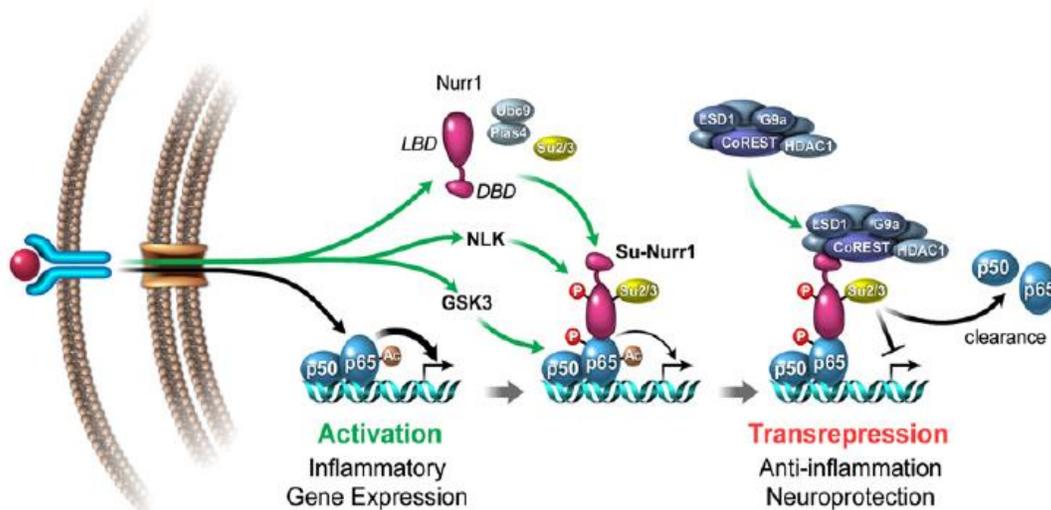
Estos TF pueden activar la transcripción de sus genes blanco en forma monomérica, homodimérica y heterodimérica. Como heterodímeros pueden formar complejos con otros TF de su misma familia o con otros receptores nucleares. Los monómeros se unen a los elementos de respuesta a NGFI-B (NGFI-B responsive element) 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) (152, 153). Además, Nur77 y Nurr1 pueden formar heterodímeros con RXR- $\alpha$  y activar la transcripción a través del elemento de respuesta DR-5 (154) **(Figura 10B)**.

Inicialmente los receptores NR4A fueron descritos como activadores de la transcripción, a través de su unión a moléculas co-activadoras (SRC-1 y -2, p300), pero estudios recientes han demostrado que también pueden reprimir la transcripción génica mediante su unión a complejos co-represores con actividad de desacetilasa y demetilasa de histonas (ej: LSD1, SMRT, CoREST, HDAC1) (155, 156).



**Figura 10. 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 de pro-opiomelanocortina (POMC), mientras que NurRE<sub>con</sub> representa el sitio NurRE que comprende sitios NBRE consenso. Nur77 y Nurr1, pero no NOR-1, heterodimerizan con RXR y se unen a las repeticiones directas del motivo de unión al receptor nuclear separados por cinco nucleótidos (DR5) (146).

Además, los NR4A pueden regular la expresión génica a través de mecanismos de “transrepresión”, interfiriendo con varias vías de señalización. Particularmente se ha reportado que Nurr1 puede reprimir la transcripción de genes inflamatorios en microglía y astrocitos de ratón, 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 (157) (Figura 11).



**Figura 11. 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 TLR-4. 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 la cinasa tipo NEMO (NLK, *nemo-like kinase*). Nurr1 puede unirse a NF- $\kappa$ B p65 fosforilado por la glucógeno sintasa cinasa-3 (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 (157).

La expresión basal de los receptores 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 (141, 158-160).

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 (158). Sin embargo, su actividad es compleja, y parece depender del contexto celular evaluado. **(Figura 12).**

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 (161)

En respuesta a estímulos inflamatorios, los genes NR4A se transcriben rápidamente, y forman parte de los genes de respuesta "temprana inmediata". Debido a que estos mismos estímulos han mostrado ser fundamentales en la regulación del estado de activación, así como en la función de los Mφs, y debido al papel central que ocupan los Mφs en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria se ha despertado un gran interés en el estudio de estos NR en estas células.

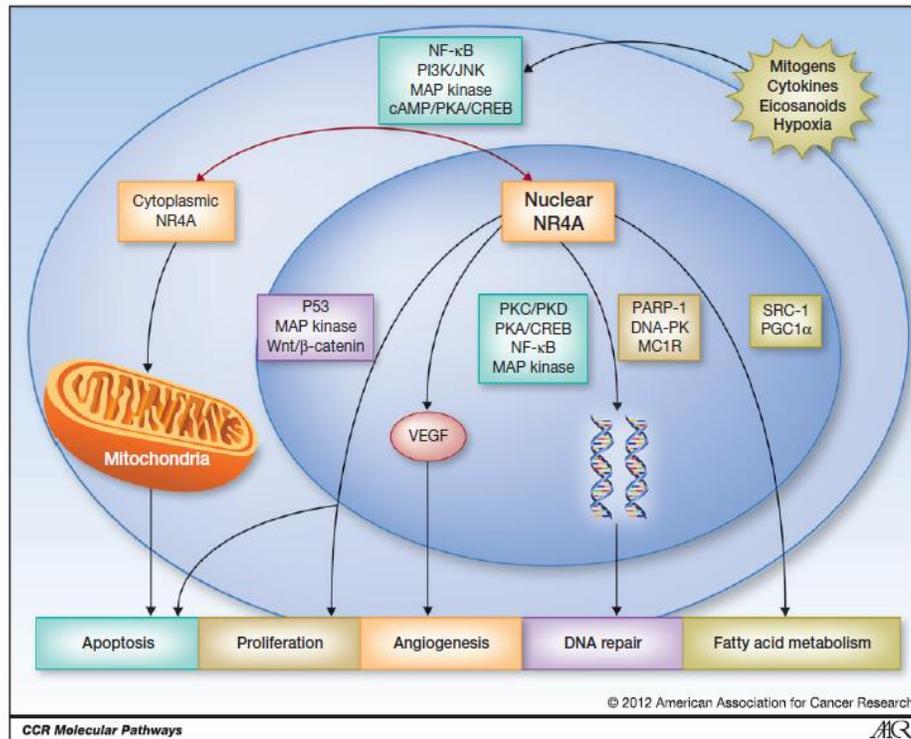
### **Receptores NR4A en los macrófagos**

Mediante experimentos realizados *in vitro* se ha mostrado que la expresión de los tres miembros de la familia NR4A es inducida fuertemente, tanto a nivel de mRNA como de proteína, en cultivos primarios y líneas celulares de Mφs humanos y murinos tras el tratamiento con diversos estímulos inflamatorios tales como LPS, TNF y oxLDL (160, 162).

Nur77, Nurr1, y NOR-1 se expresan en Mφs de lesiones ateroscleróticas y su sobreexpresión en células THP-1 (línea celular monocítica humana derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda) reduce la expresión y producción de IL-1β, IL-6, IL-8, CCL2, MIP1α y MIP1β en respuesta a LPS y TNF. Además, reducen la captación de oxLDL y regulan a la baja la expresión de los receptores scavenger SR-A, CD36 y del marcador CD11b. Estos datos sugieren un papel atero-protector para estos receptores (162).

En este contexto se ha encontrado que la deficiencia de Nur77 aumenta el desarrollo de aterosclerosis en modelos de ratón, lo cual a su vez está asociado con un cambio

en la polarización de los Mφs deficientes de Nur77 hacia un fenotipo M1, mostrando mayor activación de la vía de NF-κB tras el estímulo con LPS y una mayor expresión de TNF, IL-12, iNOs, y menor expresión de arginasa 1 (Arg1) (163).



**Figura 12. 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 que incluyen 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: proteína cinasa A (PKA)/CREB, NF-κB, (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 (159).

Además, se ha reportado que el receptor nuclear Nur77 potencia la resistencia a la sepsis inducida por el LPS en ratón. En este contexto, Mφs peritoneales aislados de ratones deficientes de Nur77 mostraron una mayor producción de TNF, IL-6, IL-1β y NO tras el estímulo con LPS. Estos animales mostraron además ser más susceptibles

al choque endotóxico, probablemente debido al exceso en la producción de citocinas y mediadores pro-inflamatorios.

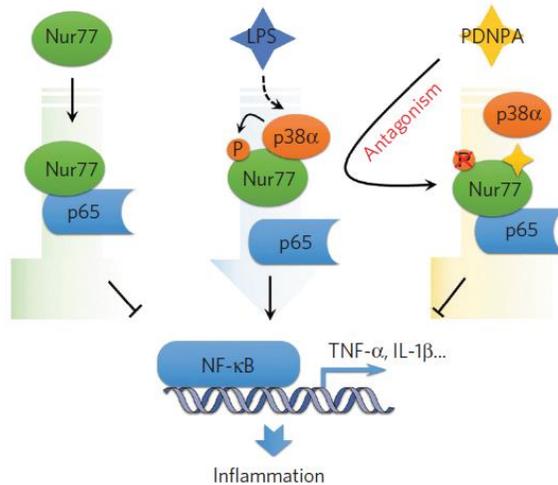
También se ha demostrado que en M $\phi$ s peritoneales de ratón, así como en células RAW264.7, Nur77 inhibe la actividad de NF- $\kappa$ B y suprime la producción de citocinas pro-inflamatorias, debido a la asociación directa con p65, bloqueando de esta manera su unión a los elementos de respuesta  $\kappa$ B en la región promotora de sus genes blanco (164) (**Figura 13**).

Por otro lado, la sobreexpresión de Nurr1 en M $\phi$ s derivados de médula ósea de ratón (BMDM, *bone marrow derived macrophages*) potencia la expresión a nivel de mRNA de genes marcadores de la polarización M2 tales como Arg1, el receptor de manosa (MR), y la proteína similar a la quitinasa (Ym1), potencia la expresión en membrana de CD36, e induce la secreción de IL-10 mientras que disminuye la de TNF e IL12 p70. De estos genes, Arg1 ha demostrado ser un blanco directo de Nurr1 al ser regulada de manera directa por la unión de Nurr1 al elemento NBRE ubicado en la región distal del promotor de Arg1.

Además, Nurr1 ha demostrado tener un papel protector en ratón en la sepsis inducida por LPS, ya que la transferencia adoptiva de M $\phi$ s transducidos con un adenovirus que expresa NR4A2 (Ad-NR4A2) protege al ratón de la endotoxemia, reduciendo los niveles séricos de citocinas pro-inflamatorias (165).

En cuanto a NOR-1, se ha demostrado que los M $\phi$ s generados mediante el cultivo de monocitos humanos con IL-4 (polarizados hacia un fenotipo M2) expresan altos niveles de NOR-1, efecto que no se observa en los M $\phi$ s murinos. Además, el silenciamiento de NOR-1 en estos M $\phi$ s provoca una disminución en la expresión, tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína, de varios marcadores característicos del fenotipo M2, entre los que se encuentra el MR, PPAR $\gamma$ , IL-1Ra e IL-10. De éstos, al menos IL-1Ra e IL-10 presentan elementos NBRE en sus promotores, por lo que pueden estar siendo regulados de manera directa por NOR-1 (166).

Todos estos resultados sugieren que los receptores NR4A podrían tener un papel importante como mediadores transcripcionales de la respuesta inflamatoria en M $\phi$ s, así como en su polarización.



**Figura 13. Papel regulador de Nur77 en la actividad de NF- $\kappa$ B durante la respuesta inflamatoria inducida por LPS.** En condiciones basales, la asociación de Nur77/NF- $\kappa$ B p65 bloquea la unión de esta subunidad a los elementos de respuesta  $\kappa$ B en la región promotora de los genes blanco. Sin embargo, tras la activación con LPS se produce una interacción directa entre la MAPK p38 $\alpha$  con el LBD de Nur77 y se lleva a cabo la fosforilación de Nur77 en las treoninas 27 y 143 (Thr-27 y -143), lo cual interfiere en su interacción con p65, permitiendo así la formación del complejo NF- $\kappa$ B, su unión al DNA y la inducción de la transcripción de sus genes blanco. El compuesto PDNPA compite con p38 $\alpha$  por la interacción con el dominio de unión a ligando y de esta manera impide la fosforilación de Nur77, inhibiendo de esta manera la transcripción de los genes río abajo de NF- $\kappa$ B en respuesta al LPS (164).

La mayoría de los estudios encaminados a la identificar la función y los genes que son regulados por estos receptores en M $\phi$ s se han basado en el análisis de M $\phi$ s murinos deficientes de los mismos, o en sistemas experimentales que implican su sobreexpresión en estas células. Sin embargo, los resultados obtenidos no son siempre consistentes. Además, en el caso particular de Nurr1, su concentración intracelular parece afectar el patrón de transcritos que regula, por lo que es posible que los ensayos que modulan artificialmente su expresión reflejen sólo una realidad parcial de su actividad (167).

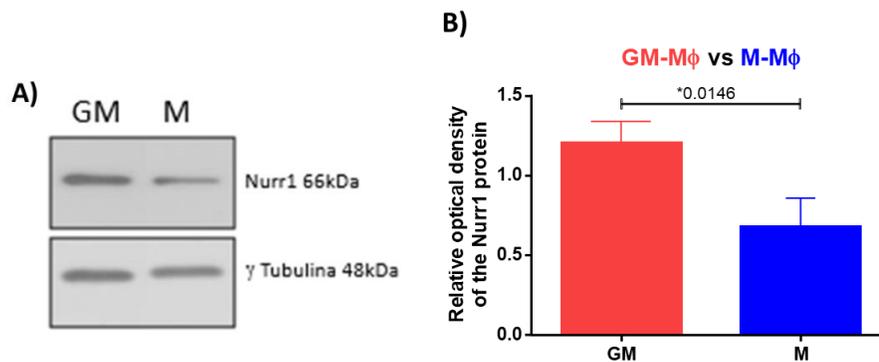
Sin duda Nur77 es el miembro de esta familia de NR más ampliamente estudiado; sin embargo, aún se conoce muy poco de estos NR y los genes que regulan en M $\phi$ s

humanos. Por este motivo, el conocimiento de la función de estos receptores en M $\phi$ s humanos polarizados servirá de base para proponerlos como blancos de nuevas terapias farmacológicas que modulen la actividad de estas células durante procesos patológicos.

## II. ANTECEDENTES DIRECTOS

### Nurr1 se expresa de manera preferencial en los macrófagos con un perfil pro-inflamatorio

Previamente en nuestro laboratorio se evaluó la expresión de Nurr1 en Mφs humanos derivados de monocitos con características pro- y anti-inflamatorias, generados mediante el cultivo de los monocitos durante seis días con GM-CSF (GM-Mφs) o M-CSF (M-Mφs). Los resultados indicaron que los GM-Mφs expresaron mayores niveles de la proteína de Nurr1 con respecto a los M-Mφs (**Figura 14**).

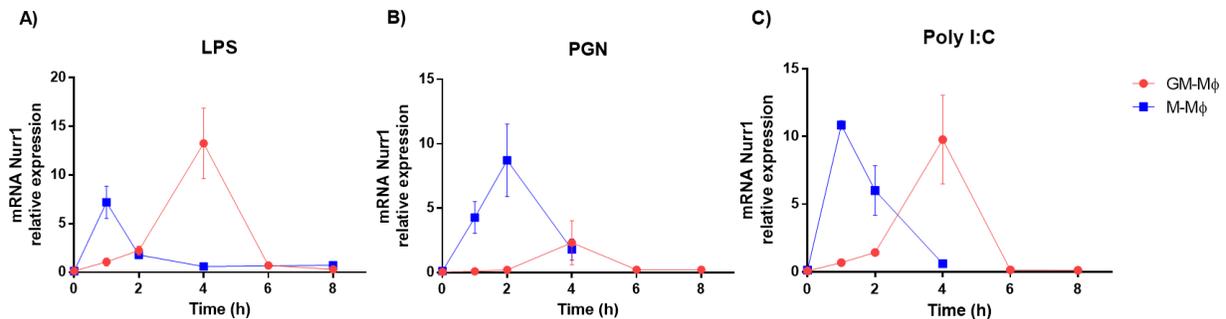


**Figura 14. Expresión basal de la proteína de Nurr1 en macrófagos pro- y anti-inflamatorios.** (A) Expresión de de Nurr1, evaluada mediante Western blot en los GM-Mφs (GM) y M-Mφs (M) obtenidos tras seis días de diferenciación. (B) Análisis densitométrico de la expresión de Nurr1 con respecto a  $\gamma$ -tubulina. Se muestra la expresión de la proteína de Nurr1 en los Mφs aislados 3 donantes independientes, indicada como la media  $\pm$  SD.

### Cinética de expresión del mRNA de Nurr1 en respuesta a distintos PAMPs

Se evaluó el cambio en el nivel de expresión del mRNA de Nurr1 en respuesta a diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como el ligando de TLR-2 PGN, el ligando de TLR-3 poly (I:C), y el ligando de TLR-4 LPS (**Figura 15**). **Cinética de expresión del mRNA de Nurr1 en respuesta a distintos PAMPs.** Cinética de expresión del mRNA de Nurr1 en los GM-Mφs y M-Mφs 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (B) y poly I:C (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (C), evaluada mediante RT-qPCR. Se muestra la expresión del mRNA de NR4A2 en los M $\phi$ s aislados de 6 donantes independientes (LPS) o de 3 donantes independientes (PGN y poly I:C), indicada como la media  $\pm$  SD..

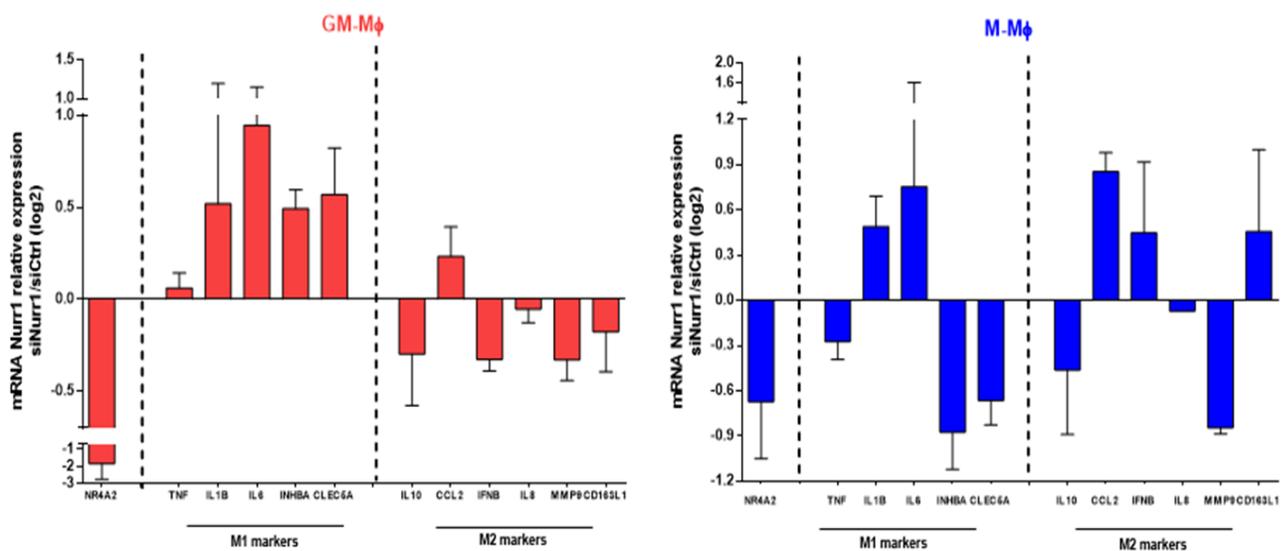


**Figura 15. Cinética de expresión del mRNA de Nurr1 en respuesta a distintos PAMPs.** Cinética de expresión del mRNA de Nurr1 en los GM-M $\phi$ s y M-M $\phi$ s sin estimular (0 h) y a los tiempos de 1, 2, 4, 6 y 8 h tras el estímulo con LPS (100 ng/mL) (A), PGN (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (B) y poly I:C (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (C), evaluada mediante RT-qPCR. Se muestra la expresión del mRNA de NR4A2 en los M $\phi$ s aislados de 6 donantes independientes (LPS) o de 3 donantes independientes (PGN y poly I:C), indicada como la media  $\pm$  SD.

Los resultados indican que los tres ligandos indujeron un incremento en la expresión del mRNA de Nurr1 en ambas poblaciones de M $\phi$ s. Las cinéticas de expresión fueron muy similares, presentando un pico de inducción a las 4 h en los GM-M $\phi$ s y más temprano en los M-M $\phi$ s; con un pico de inducción al tiempo de 1h tras los estímulos con LPS y poly (I:C), y a las 2 h tras el estímulo con PGN. Además las diferencias en los niveles de inducción en los GM-M $\phi$  así como en el pico de inducción en los M-M $\phi$  sugieren una mayor eficiencia de la vía de señalización independiente de MyD88 en la inducción de Nurr1, ya que como se sabe, la señalización independiente de MyD88 se induce en respuesta a los estímulos con LPS y poly (I:C) pero no tras el estímulo con PGN.

## Nurr1 parece ser un regulador negativo de la función inflamatoria de los macrófagos pro-inflamatorios

De manera interesante, en los GM-M $\phi$ s 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. Sin embargo, en los M-M $\phi$ s la transfección con el siNurr1 arrojó resultados más heterogéneos, presentando tanto inducción como supresión de la expresión de genes correspondientes a ambos fenotipos (**Figura 16**). En conjunto, estos datos sugieren que Nurr1 podría funcionar como un regulador negativo del perfil inflamatorio en las GM-M $\phi$ s, pero no en los M-M $\phi$ s.



**Figura 16. Expresión de marcadores de polarización en 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*) y de genes asociados a un fenotipo M2 (*IL10*, *CCL2*, *IFNB*, *IL8*, *MMP9* y *CD163L1*), así como de *NR4A2*, en los GM-M $\phi$ s y M-M $\phi$ s tras el silenciamiento de Nurr1 con un siRNA dirigido contra el mRNA de Nurr1 (100 nM) o un siRNA control (siCtrl, 100 nM). Las gráficas representan 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.

### III. JUSTIFICACIÓN

Los M $\phi$ s son células del sistema inmune innato que presentan una gran diversidad de funciones para el mantenimiento de la homeostasis del organismo, tales como la defensa frente a patógenos, la fagocitosis de células apoptóticas, la regulación de los procesos inflamatorios, así como la de la respuesta inmune. Varios miembros de la superfamilia de NR han mostrado ser importantes reguladores de la función de los M $\phi$ s. Recientemente, el estudio de los miembros de la familia de NR huérfanos NR4A ha sido de particular interés, por su asociación con varios aspectos de la respuesta inflamatoria y su estudio en M $\phi$ s sugiere un importante papel como regulador transcripcional en estas células. El conocer las funciones, así como los genes blanco de los receptores NR4A en la regulación transcripcional de M $\phi$ s humanos polarizados, podría sentar las bases para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas encaminadas a modular la actividad de estas células en diversas patologías inflamatorias en las que los M $\phi$ s ocupan un papel central.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Nurr1 se expresa de manera preferencial en los M $\phi$ s humanos con un perfil pro-inflamatorio. Sin embargo, el papel que desempeña es como un regulador negativo de la función inflamatoria en estas células.

#### **V. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la función del receptor nuclear Nurr1 en los macrófagos humanos con un perfil pro-inflamatorio.

#### **VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**Objetivo 1. Determinar la expresión y regulación de Nurr1 en los M $\phi$  humanos polarizados**

**Objetivo 2. Determinar la contribución del receptor nuclear Nurr1 a la funcionalidad de los M $\phi$  humanos**

- a) Evaluar la expresión génica de marcadores relacionados con la polarización de los M $\phi$ s.
- b) Evaluar la expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias en condiciones basales y en respuesta a LPS.
- c) Determinar el efecto de Nurr1 sobre diversas funciones asociadas a la polarización M1 y M2: producción de especies reactivas de oxígeno (M1) y capacidad de fagocitosis (M2)

**Objetivo 3. Identificar algunos de los mecanismos de acción de Nurr1 en los M $\phi$ s humanos**

## 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 el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea. Las células fueron sometidas a un gradiente de densidad con Lymphoprep (densidad 1.077 g/mL). Las células fueron centrifugadas a 800 xg durante 30 min a temperatura ambiente y se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) 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 macrófagos pro- y anti-inflamatorios

Los monocitos CD14+ fueron cultivados a una densidad de  $0.5-0.7 \times 10^6$  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 $\phi$ s o M-M $\phi$ s respectivamente. El cultivo se mantuvo durante 6 días, tras los cuales se obtuvieron M $\phi$ s maduros completamente diferenciados. Ocasionalmente, en el sexto día de diferenciación los M $\phi$  fueron estimulados con peptidoglicano (PGN, [10  $\mu$ g/m], InvivoGen), ácido poliinosínico-policitidílico [poly (I:C), [50  $\mu$ g/m], InvivoGen], o LPS de *E. coli* ([100 ng/mL], Sigma-Aldrich). Para algunos experimentos al sexto día de diferenciación los M $\phi$ s se estimularon con los agonistas de Nurr1, C-DIM12 (1 o 10  $\mu$ M, Sigma-Aldrich) o IP7e (1 o 10  $\mu$ M, Tocris Bioscience).

### 7.3. Ensayos de Western blot

Los GM-M $\phi$ s y M-M $\phi$ s 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. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF. Posteriormente, 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 anticuerpos (Abs) primarios anti-Nurr1 (F-5, #sc-376984), anti-GAPDH (6C5, #sc-32233), anti-lamin B1 (B-10, #sc-374015) (Santa Cruz Biotechnology), anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  (44D4, #4812), anti-phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  (Ser32) (14D4, #2859), anti-NF- $\kappa$ B p65 (D14E12, #3033) (Cell Signaling Technologies), or anti  $\gamma$ -tubulina (GTU-88, #T6557, Sigma-Aldrich) en TBS-T con 0.1% BSA. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-T e incubadas con los correspondientes Abs secundarios conjugados a peroxidasa (Invitrogen). La reacción se reveló mediante el sistema de quimioluminiscencia Immun-Star<sup>TM</sup> (BioRad Laboratories) y para el análisis densitométrico de las bandas se empleó el software Fiji (*Fiji Is Just ImageJ*).

### 7.4. Inhibición de las vías de NF- $\kappa$ B y MAPKs

Los M $\phi$ s fueron cultivados y diferenciados en placas de 12 pozos (GM-M $\phi$ s =  $0.5 \times 10^6$  cel/mL, M-M $\phi$ s =  $0.7 \times 10^6$  cel/mL) en 1.5 mL de medio y al sexto día de diferenciación fueron tratados por 1 h con alguno de los siguientes inhibidores: inhibidor de la MAPK p38 (BIRB 796, 0.1  $\mu$ M), inhibidor de MEK1/2 (UO126, 2.5  $\mu$ M), inhibidor de la MAPK JNK (SP600125, 30  $\mu$ M), inhibidor de IKK- $\alpha$  (BAY-117082, 10  $\mu$ M), o con 0.01% DMSO como control. Posteriormente se estimuló a los GM-M $\phi$ s (4 h) y a los M-M $\phi$ s (1 h) con LPS (100 ng/mL), se extrajo el RNA y se cuantificó el mRNA de Nurr1 mediante q-PCR.

## 7.5. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó con el reactivo Trizol® (Ambion). Se añadieron 400 µL de trizol a  $0.5-0.7 \times 10^6$  células. Posteriormente, la mezcla se agitó en vórtex y se conservó 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 80 µL 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 µL de isopropanol 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 µL 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 µL de agua-DEPC. El RNA se incubó a 60°C por 10 min y finalmente se cuantificó y evaluó su integridad en un gel de agarosa al 1%.

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

Una vez obtenido el RNA, el cDNA fue sintetizado 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 por 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
<b>Temperatura</b>	50°C	95°C	95°C	60°C
<b>Tiempo</b>	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 del gen *TATA-box binding protein (TBP)*. Para comparar los niveles de transcritos entre dos condiciones problema se empleó la fórmula  $Qr = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ , donde el  $\Delta\Delta Ct$  entre dos condiciones se calculó con la siguiente fórmula:

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

### **7.7. Microscopía Confocal**

Los M $\phi$ s fueron cultivados sobre cubreobjetos, en placas de 24 pozos. Posteriormente, los M $\phi$ s fueron pre-tratados con C-DIM12 por 2 h o con DMSO como control y luego fueron estimulados o no con LPS por 0.5-2h. Después las células fueron fijadas con paraformaldeído al 4%, permeabilizadas con Triton X-100 al 0.03% en PBS e incubadas con un Ab primario anti-NF- $\kappa$ B p65 (D14E12, Cell Signaling Technologies) o con un Ab control de isotipo. Posteriormente las células fueron teñidas con un Ab secundario anti-conejo marcado con Cy<sup>TM</sup>5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Los núcleos y el citoesqueleto se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y faloidina conjugada con rodamina, respectivamente. Las imágenes se adquirieron con un microscopio Confocal SP8 (Leica Microsystems).

### **7.8. Detección intracelular de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Las especies reactivas de oxígeno fueron detectadas utilizando el reactivo CellROX<sup>TM</sup> Deep Red dye (Thermo Fisher Scientific). Las células fueron pre-tratadas con C-DIM12, IP7e, o DMSO como control, durante 4 h. Posteriormente los M $\phi$ s fueron expuestos durante 1 h a PMA (50 ng/mL) e ionomicina (500 ng/mL); pasado este tiempo las células fueron incubadas con el reactivo CellROX<sup>TM</sup> Deep Red (5  $\mu$ M) por 30 min a 37°C. La intensidad de fluorescencia fue determinada mediante citometría de flujo. Los resultados se expresaron como porcentaje del valor control (muestra tratada con DMSO).

### **7.9. Ensayo de fagocitosis**

Los M $\phi$ s fueron cultivados con partículas de zymosan-FITC sin opsonizar u opsonizadas con suero fresco humano (5 partículas/célula) por 1 o 2 h a 37°C. La

fagocitosis se detuvo lavando las células con PBS frío con 0.1% de BSA y 0.01% de azida de sodio. Como controles de internalización se emplearon células incubadas con partículas de zymosan-FITC a 4°C. Posteriormente las células fueron evaluadas mediante citometría de flujo.

### **7.10. Silenciamiento de Nurr1**

Los GM-Mφs 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 µL 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 µL de RPMI 1640 (sin SFB), 12 µL de siRNA (concentración final 100 nM, Ambion), y 12 µL de *HiPerFect Transfection Reagent*. La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de transfección. 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 una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Pasadas las 6 h se adicionaron 800 µL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB y se adicionó la citocina polarizante GM-CSF. El RNA y la proteína se extrajeron 48 h después de la transfección, mediante el kit NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein (Macherey-Nagel). El análisis de silenciamiento de Nurr1 fue realizado mediante q-PCR y Western blot.

### **7.11. Endocitosis de Lípidos oxidados**

Los GM-Mφs fueron cultivados en placas de 24 pozos a una densidad de  $0.5 \times 10^6$  cel/mL y pre-tratados con DMSO o C-DIM12 (10 µM) durante 24 h. Posterior a este tiempo los Mφs fueron cultivados con el reactivo Dil-oxLDL (5 mg/mL, Invitrogen<sup>™</sup>) por 4 h. Concluido este tiempo se recuperaron las células y se evaluó la captación de Dil Ox-LDL mediante citometría de flujo.

### 7.12. Expresión de CD36

El análisis de la expresión de CD36 se realizó en M $\phi$  completamente diferenciados cultivados durante 24 h con el agonista C-DIM12 (10  $\mu$ M) o DMSO como control. Concluido este tiempo se llevó a cabo el marcaje con un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD36 humano (BD Biosciences) o con un anticuerpo control de isotipo durante 30 min. Posteriormente se incubaron las células con un anticuerpo anti-inmunoglobulinas (Ig) de ratón acoplado a FITC. Finalmente, las células se resuspendieron en 300  $\mu$ l de tampón fijador y se analizó la expresión de CD36 mediante citometría de flujo.

### 7.13. Análisis de gen reportero

Los GM-M $\phi$ s fueron transfectados con 1  $\mu$ g de DNA reportero de NF- $\kappa$ B (Signal® NF- $\kappa$ B Reporter Assay Kit, Qiagen) usando el reactivo Viromer RED (Lipocalyx) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla del plásmido reportero contiene una construcción de la luciferasa *firefly* sensible a NF- $\kappa$ B y una construcción de la luciferasa *Renilla* que se expresa de manera constitutiva para normalizar la eficiencia de la transfección (40:1). Después de la transfección, las células se cultivaron durante toda la noche antes de la exposición a LPS por 12 h, y luego fueron lisadas. Las actividades de las luciferasas *firefly* y *Renilla* se determinaron utilizando el Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega).

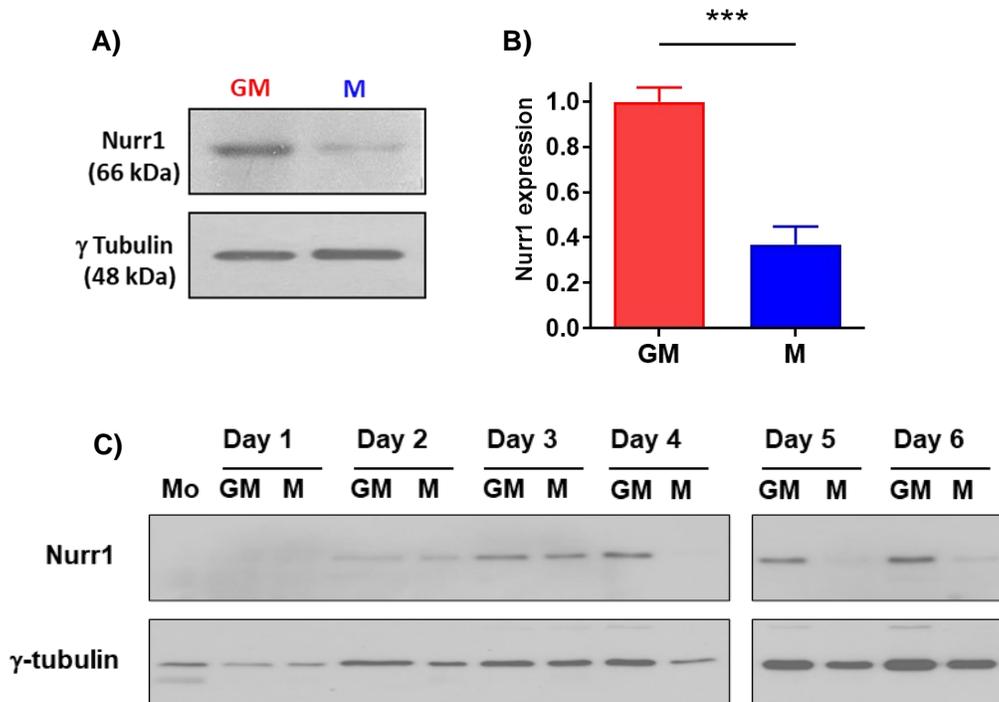
### 7.14. Análisis estadístico

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

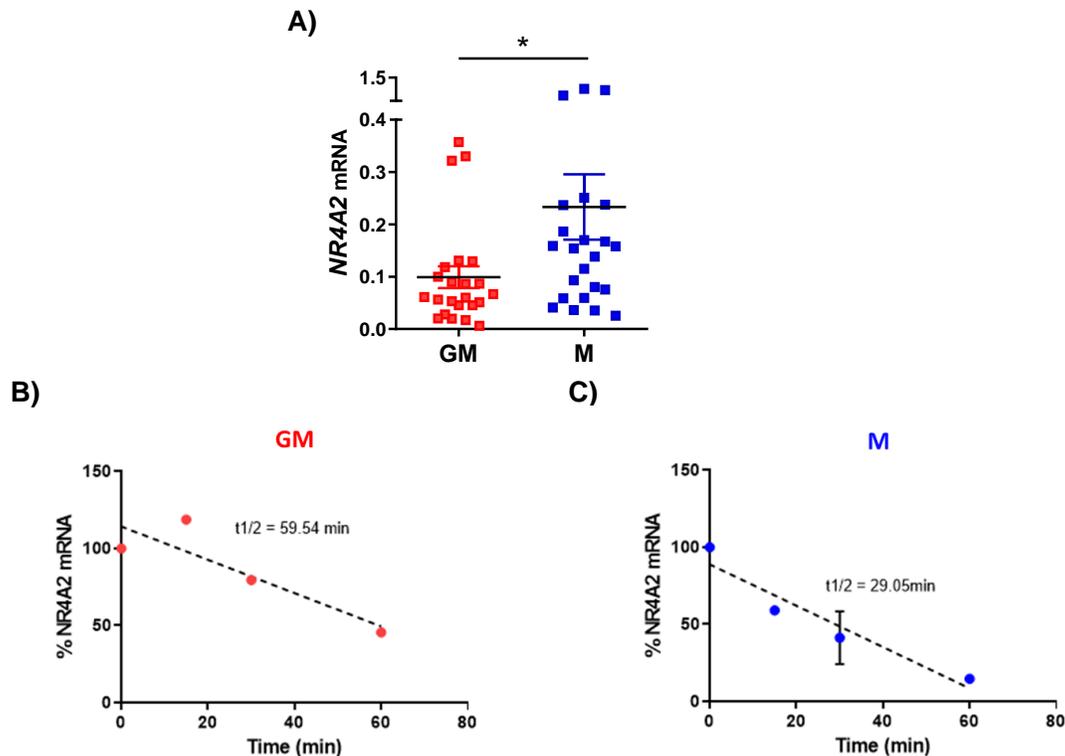
### 8.1. Expresión diferencial de Nurr1 en los macrófagos pro- y anti-inflamatorios

Se evaluó la expresión del mRNA, así como de la proteína de Nurr1 en ambas poblaciones de M $\phi$ s. Para ello se obtuvo el RNA y la proteína de los GM-M $\phi$ s y M-M $\phi$ s diferenciados durante seis días y se evaluó el mRNA y la proteína de Nurr1 mediante q-PCR y Western blot respectivamente. En concordancia con los resultados previamente observados en 3 donantes durante la maestría, se observó una expresión preferencial de Nurr1 en los M $\phi$ s con un perfil pro-inflamatorio (GM-M $\phi$ s) (**Figura 17 A y B**). Esta expresión diferencial se establece durante los últimos días del proceso de diferenciación, ya que como se ha observado en resultados previos del laboratorio, la expresión de la proteína Nurr1 es prácticamente indetectable en las células precursoras (monocitos CD14+). Esta se induce, pero se mantiene baja y muy similar en ambos subtipos de M $\phi$ s durante los primeros días de cultivo, y no es hasta el día 4 en que la expresión preferencial de Nurr1 en los GM-M $\phi$ s se vuelve evidente y se mantiene así hasta el final del cultivo. Estos resultados indican que la inducción de Nurr1 en los GM-M $\phi$ s es progresiva mientras que en los M-M $\phi$ s es transitoria (**Figura 17 C**).



**Figura 17. Expresión de la proteína de Nurr1 en GM-M $\phi$ s y M-M $\phi$ s.** (A) Imagen representativa de la expresión de Nurr1 evaluada mediante Western blot en los GM-M $\phi$ s (GM) y M-M $\phi$ s (M) obtenidos tras seis días de diferenciación. (B) Análisis densitométrico de la expresión de Nurr1 con respecto a  $\gamma$ -tubulina. Se muestra la expresión de la proteína de Nurr1 en los M $\phi$ s aislados de 7 donantes independientes, indicada como la media  $\pm$  SD. (C) Western blot representativo de la expresión de Nurr1 a lo largo del proceso de diferenciación.

Por otro lado, mediante la q-PCR se observó claramente un mayor nivel del mRNA *NR4A2* en los M $\phi$ s del fenotipo anti-inflamatorio (M-M $\phi$ s) (**Figura 18 A**). De manera interesante, al evaluar la estabilidad del mRNA en ambas poblaciones de M $\phi$ s encontramos una mayor vida media del mRNA *NR4A2* (~1 h) en los GM-M $\phi$ s comparada a la observada en los M-M $\phi$  (~30 min) (**Figura 18 B y C**). En conjunto estos resultados indican una regulación post-transcripcional distinta en ambos fenotipos de M $\phi$ s.

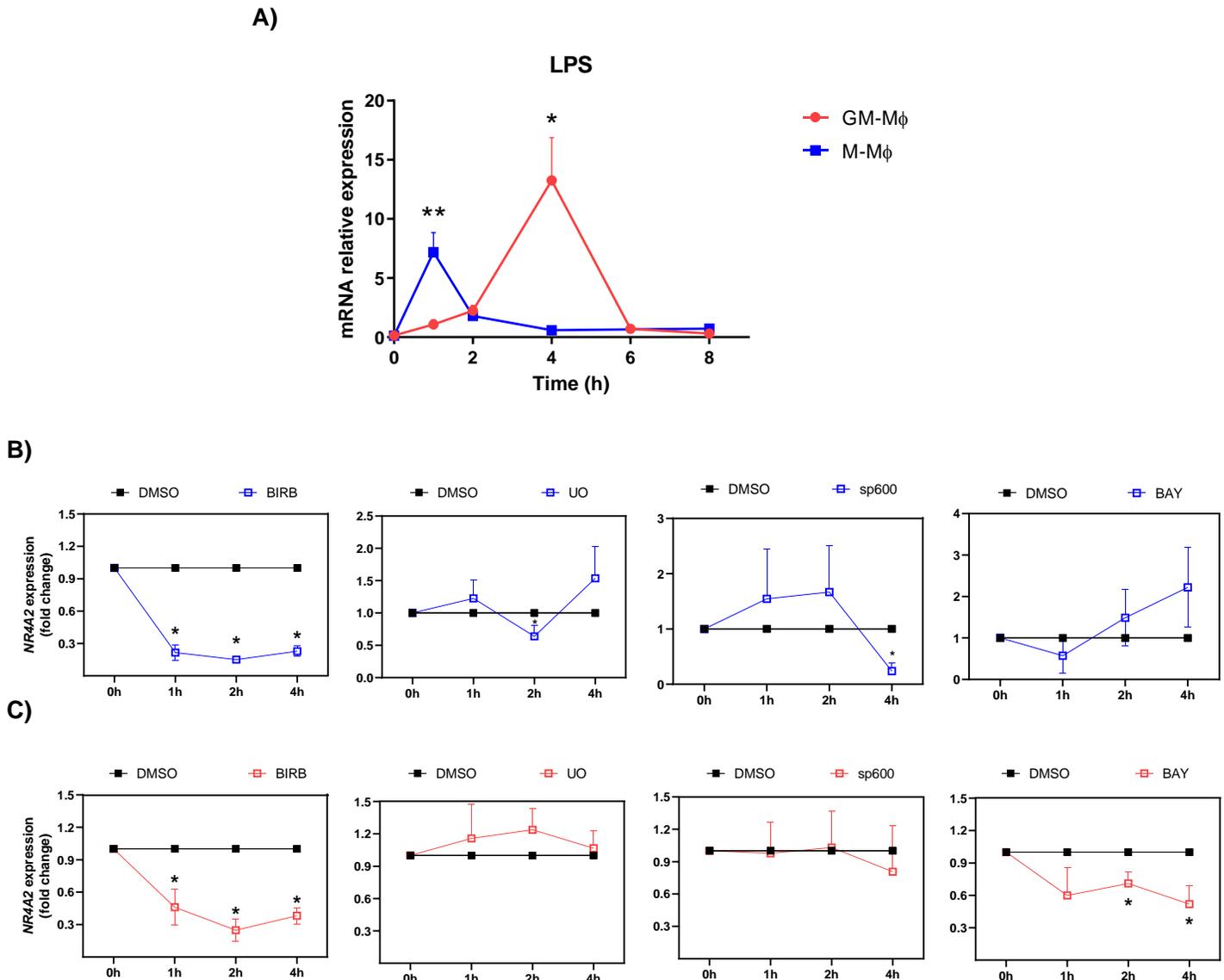


**Figura 18. Expresión basal del mRNA de Nurr1 en GM-Mφs y M-Mφs.** (A) Expresión de *NR4A2*, evaluada mediante RT-qPCR en los GM-Mφs (GM) y M-Mφs (M) obtenidos tras seis días de diferenciación. Cada símbolo representa el dato de un donante independiente (n = 23; \*, p < 0,05). (B-C) Evaluación de la vida media del transcrito de NRA42 en GM-Mφs (B) y M-Mφs (C). Se muestran los resultados de 2 donantes independientes.

## 8.2. La inhibición de p38 y NF-κB en los macrófagos humanos disminuye la expresión del mRNA de *NR4A2* en respuesta a LPS.

Durante el proyecto de Maestría se observó que en respuesta a diferentes ligandos de los TLRs (dentro de ellos el LPS) se induce la expresión del mRNA de *NR4A2* en ambas poblaciones de Mφs (**Figura 15**). La cinética de expresión en respuesta a estos diferentes PAMPs mostró ser siempre más temprana en los M-Mφs (1 h) con respecto a la observada en los GM-Mφs (4 h), como se muestra en la gráfica de respuesta al LPS (**Figura 19 A**). Como un primer acercamiento para elucidar las vías de señalización que inducen la expresión de *NR4A2* evaluamos la expresión de este gen en ambas poblaciones de Mφs tras la inhibición de las vías de las MAPKs, así como de la vía de NF-κB. Para ello empleamos los reactivos BIRB 796 (0.1 μM) como

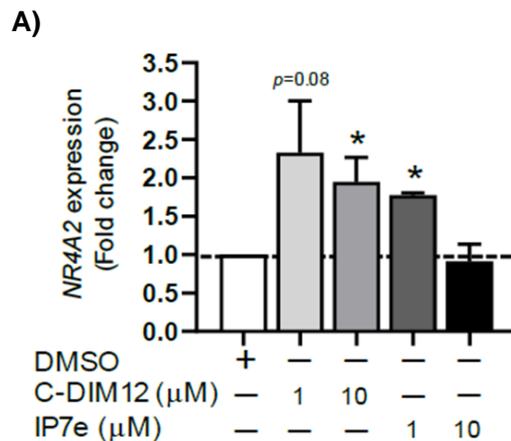
inhibidor de la MAPK p38, UO126 (2.5  $\mu$ M) como inhibidor de MEK1/2, SP600125 (30  $\mu$ M) como inhibidor de la MAPK JNK, y BAY-117082 (10  $\mu$ M) como un inhibidor irreversible de IKK $\alpha$  y de la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ . Cada uno de estos inhibidores fueron añadidos 1 h 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 M $\phi$ s (4 h para GM-M $\phi$ s y 1 h para M-M $\phi$ s). Los niveles de inducción del mRNA de *NR4A2* en respuesta al LPS se redujeron en ambas poblaciones de M $\phi$  tras la inhibición de p38, así como tras el bloqueo de la vía de NF- $\kappa$ B en los GM-M $\phi$ s (**Figura 19 B y C**). Este resultado sugiere que, de las vías analizadas, p38 y NF- $\kappa$ B podrían estar involucrados en la inducción de la expresión de *NR4A2* en respuesta a LPS.

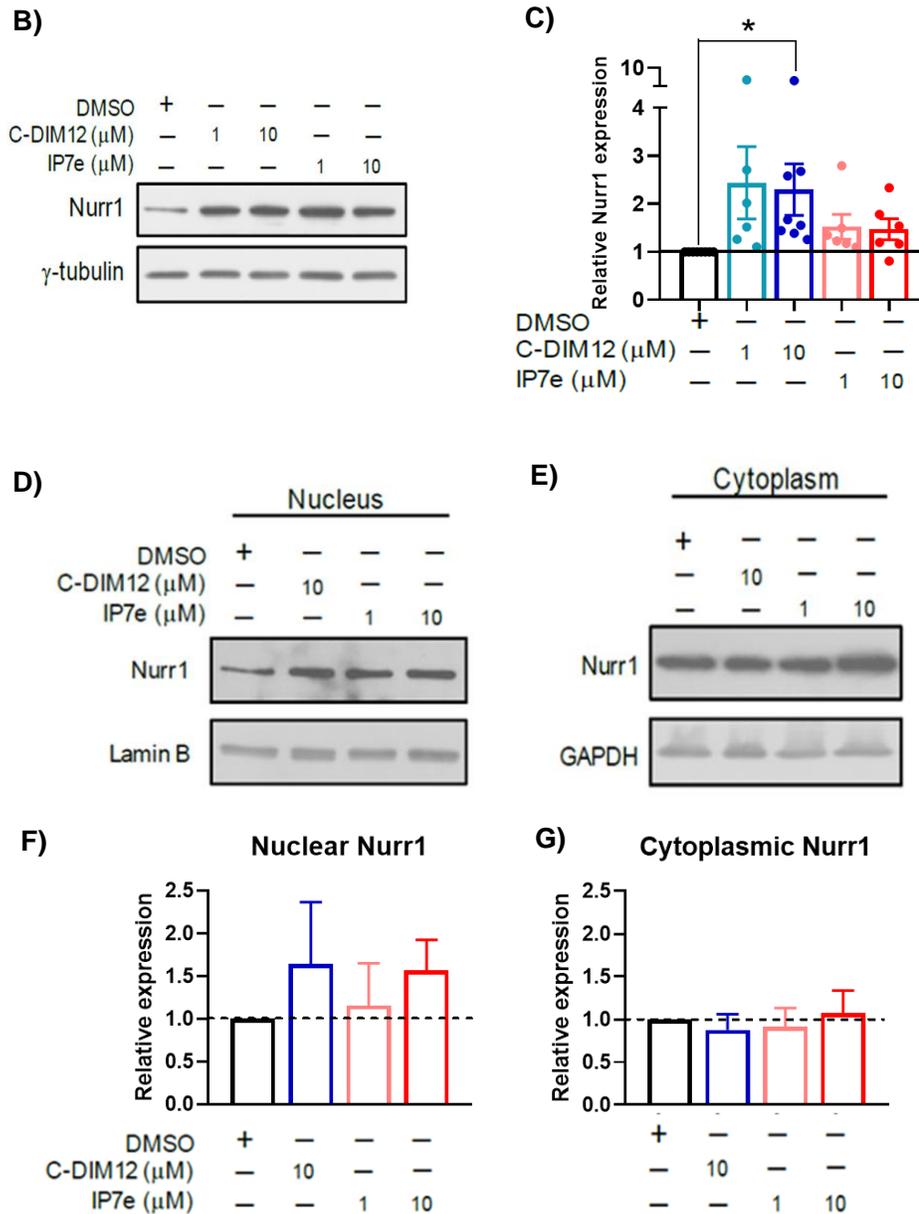


**Figura 19. Cinética de expresión de NR4A2 en respuesta a LPS y tras la inhibición de las MAPKs y NF- $\kappa$ B.** (A) Cinética de expresión del mRNA de Nurr1 en los GM-M $\phi$ s y M-M $\phi$ s sin estimular (0 h) y a los tiempos de 1, 2, 4, 6 y 8 h tras el estímulo con LPS (100 ng/mL) evaluada mediante RT-qPCR. Se muestra la expresión del mRNA de NR4A2 en los M $\phi$  aislados de 6 donantes independientes tras el estímulo de LPS indicada como la media  $\pm$  SD (B) y (C) Expresión relativa de NR4A2 tras la estimulación de los M-M $\phi$ s (B) y GM-M $\phi$ s (C) con LPS (100 ng/mL), en presencia de los inhibidores BIRD 796 (0.1  $\mu$ M), UO126 (2.5  $\mu$ M), SP600125 (30  $\mu$ M) y BAY-117082 (10  $\mu$ M), o DMSO como control. Tanto los inhibidores como el DMSO fueron añadidos 1 h antes del estímulo con LPS. La evaluación del transcrito se realizó mediante RT-qPCR. Los valores en presencia de los inhibidores se expresan en relación con los obtenidos en los M $\phi$ s cultivados con DMSO en cada punto temporal evaluado. Media  $\pm$  SEM (n = 3; \* p < 0,05).

### 8.3. El empleo de los agonistas C-DIM12 e IP7e tiende a aumentar la expresión, así como la localización nuclear de Nurr1 en los GM-Mφs

Debido a las diferencias encontradas en cuanto a los niveles de expresión de Nurr1 en ambos fenotipos de Mφs, y resultados previos en los que se observó que Nurr1 podría ser un regulador negativo del perfil inflamatorio en los GM-Mφs, pero no en los M-Mφs (**Figura 16**), decidimos evaluar el papel que pudiera estar jugando este factor de transcripción en la función y el fenotipo pro-inflamatorio de los Mφs humanos. Para ello empleamos los agonistas de Nurr1, C-DIM12 e IP7e. El tratamiento de los GM-Mφs con ambos agonistas indujo la expresión del mRNA *NR4A2* (**Figura 20 A**), mientras que el tratamiento con C-DIM12 también indujo de manera significativa la expresión de la proteína (**Figura 20 B y C**), lo cual está en concordancia con lo previamente descrito en otros estudios (168, 169). Además, el tratamiento con C-DIM12 o IP7e a la concentración más alta evaluada (10 μM) mostró una tendencia a incrementar la cantidad de Nurr1 en el núcleo (**Figura 20 D y E**).

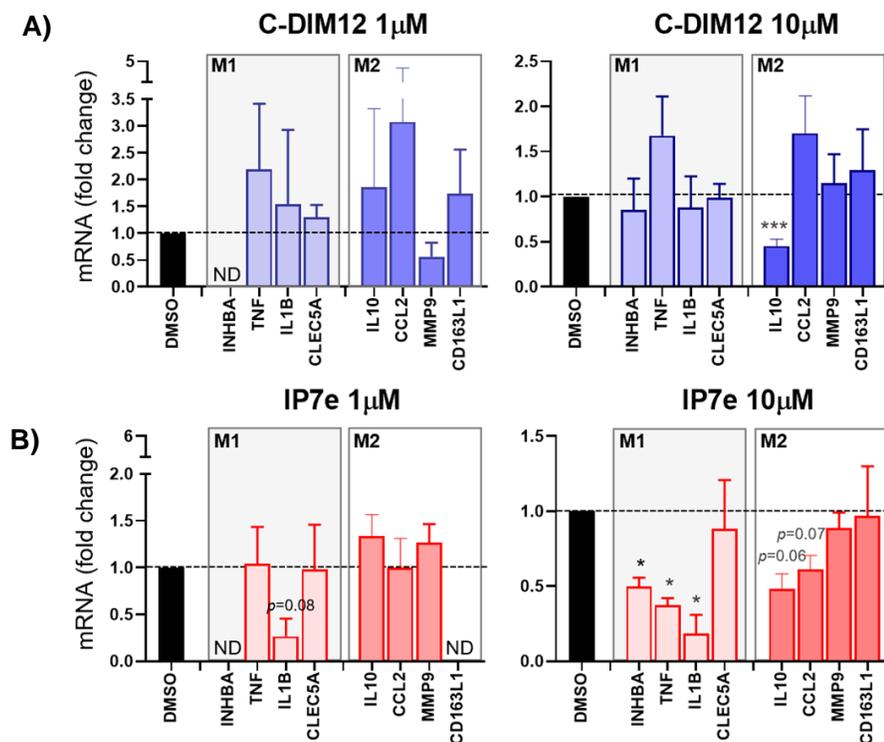




**Figura 20. Inducción de Nurr1 tras el empleo de los agonistas C-DIM12 e IP7e.** Los GM-M $\phi$ s fueron tratados con C-DIM12 (1 o 10  $\mu\text{M}$ ), IP7e (1 o 10  $\mu\text{M}$ ) o con DMSO por 4 h. (A) Expresión relativa del gen *NR4A2* evaluada por RT-qPCR. Los resultados son expresados relativos a los niveles de mRNA en presencia de DMSO. (B) Western blot representativo y (C) gráfica de los niveles de expresión de Nurr1 con respecto a  $\gamma$ -tubulina después de 4 h de tratamiento con los agonistas ( $n = 6-8$ ; \*,  $p < 0.05$ ). (D) Western blots representativos de la expresión de Nurr1 en el núcleo y (E) en el citoplasma en los GM-M $\phi$ s tratados con los agonistas. (F) Cuantificación de los niveles de expresión de Nurr1 relativos a la expresión de la proteína lamin B (para el núcleo) y (G) GAPDH (para el citoplasma) ( $n = 4-5$ ).

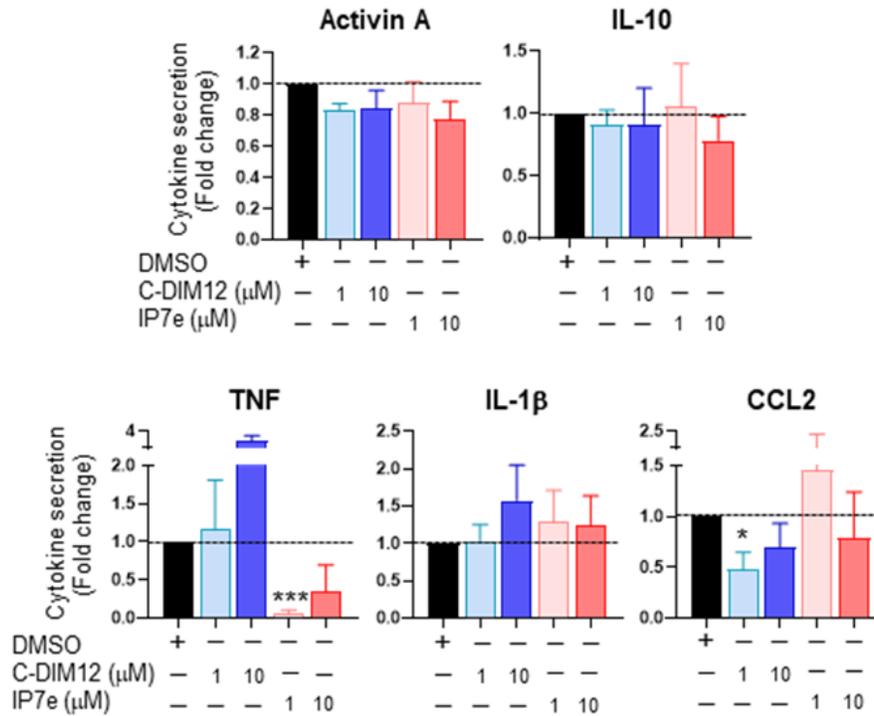
#### 8.4. La activación de Nurr1 no modifica de manera global el estado de polarización de los GM-M $\phi$ .

Después decidimos investigar si la activación de Nurr1 con estos agonistas afecta el estado de polarización de los GM-M $\phi$ s. La expresión de marcadores asociados al fenotipo M1 (*INHBA*, *TNF*, *IL1B*, y *CLEC5A*) y de marcadores asociados al fenotipo M2 (*IL-10*, *CCL2*, *MMP9* y *CD163L1*) fue evaluada en los GM-M $\phi$ s expuestos a C-DIM12 o IP7e. No se detectó un cambio claro en el fenotipo de los M $\phi$ s con ninguno de los agonistas (**Figura 21 A y B**). Una excepción fueron las células tratadas con IP7e 10  $\mu$ M, donde varios de los marcadores M1 fueron regulados a la baja (*INHBA*, *TNF* e *IL1B*). Sin embargo, en estas células también observamos una disminución en la expresión de los genes *IL10* y *CCL2* asociados al fenotipo M2 (**Figura 21B**).



**Figura 21. Expresión de marcadores de la polarización en respuesta a la activación de Nurr1 con los agonistas C-DIM12 e IP7e.** Los GM-M $\phi$ s fueron tratados con C-DIM12 (1 o 10  $\mu$ M) (A), IP7e (1 y 10  $\mu$ M) (B), o DMSO por 4 h. La expresión de los genes asociados al fenotipo M1 (*INHBA*, *TNF*, *IL1B*, y *CLEC5A*) y los genes asociados al fenotipo M2 (*IL-10*, *CCL2*, *MMP9* y *CD163L1*) fue determinada mediante RT-qPCR (n = 2–7; \*, p < 0.05, \*\*\*, p < 0.0005). ND: no determinada.

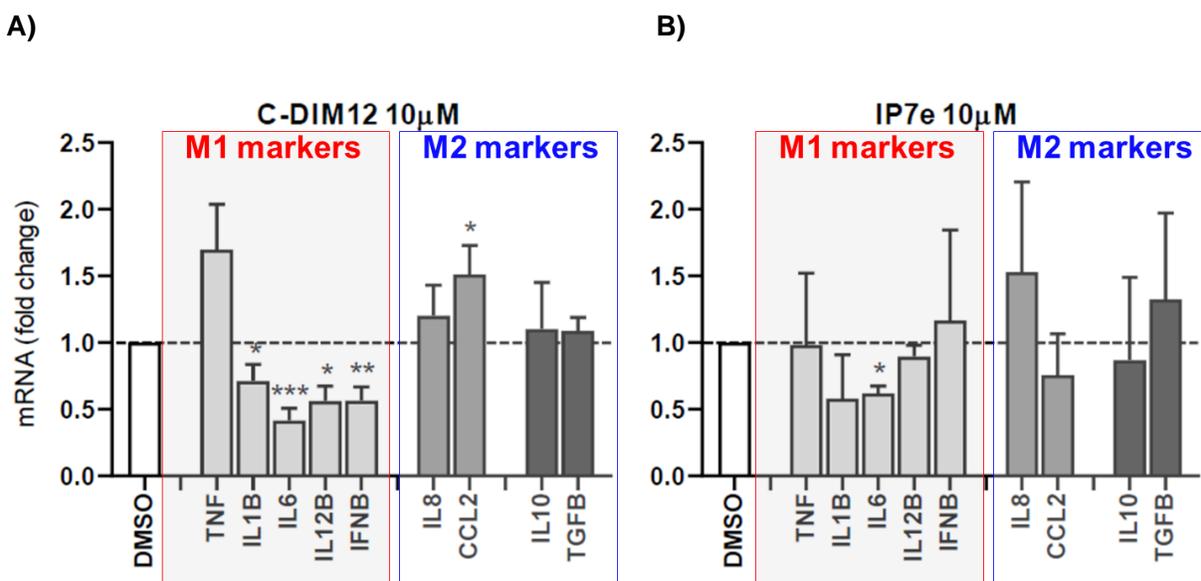
Posteriormente, evaluamos los niveles de las citocinas solubles en el sobrenadante de los cultivos. Dos factores solubles endógenos clave que gobiernan la diferenciación M1/M2 con las citoquinas polarizantes empleadas en este estudio (GM-CSF y M-CSF) son la activina A y la IL-10, producidas constitutivamente por los GM-M $\phi$ s (170) y los M-M $\phi$ s (171), respectivamente. El tratamiento con los agonistas de Nurr1 no afectó la cantidad de activina A e IL-10 producida por los GM-M $\phi$ s (**Figura 22**). Vale la pena mencionar que la producción constitutiva de IL-10 estuvo por debajo del límite de detección de nuestro ensayo en la mayoría de los donantes analizados. La secreción de las citocinas asociadas al fenotipo M1 (TNF e IL-1 $\beta$ ) así como la de la quimiocina CCL2 asociada al fenotipo M2 también fueron evaluadas. Si bien no hubo variación en las cantidades de IL-1 $\beta$ , IP7e disminuyó significativamente los niveles de TNF y C-DIM12 los de CCL2 (**Figura 22**). En consecuencia, aunque la activación de Nurr1 no induce un cambio global en el estado de polarización de los GM-M $\phi$ s, su agonista IP7e suprime la producción de factores inflamatorios fuertemente asociados con los M $\phi$ s M1.



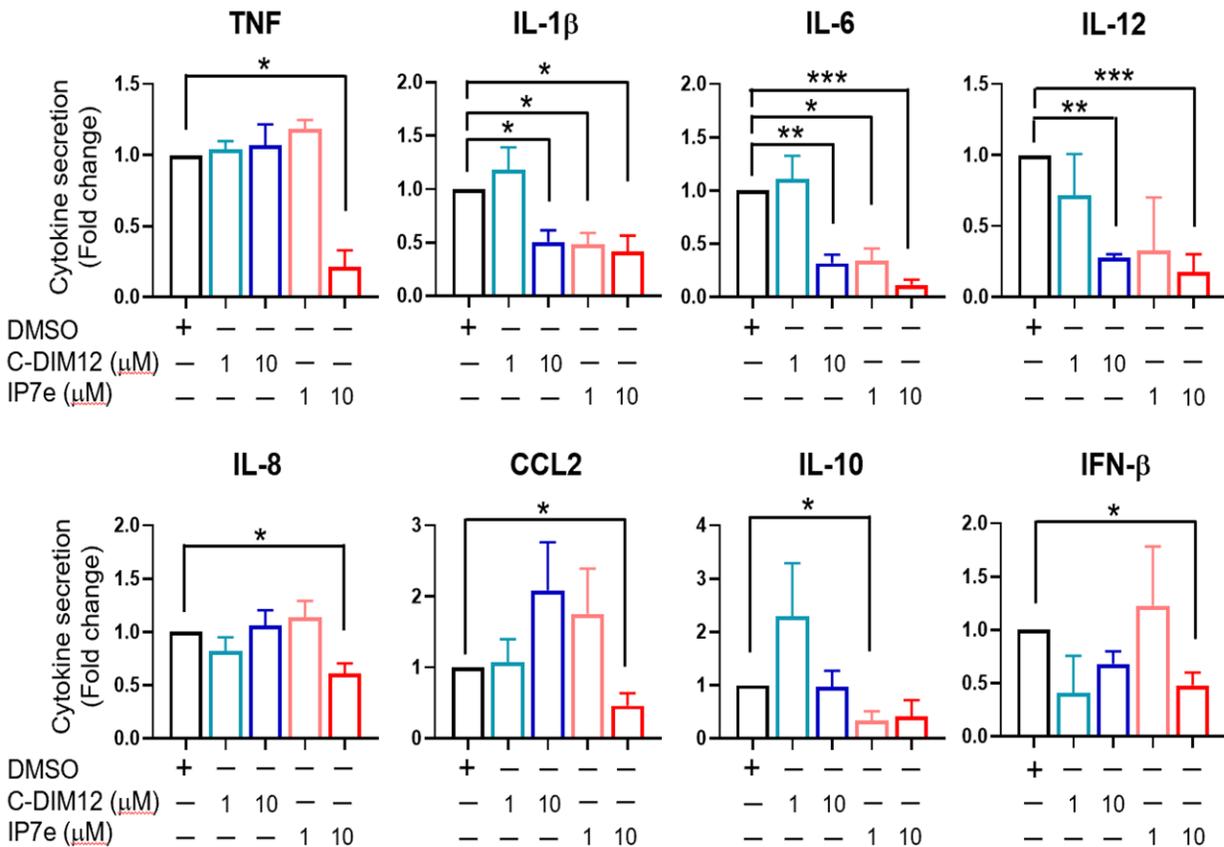
**Figura 22. Producción de citocinas en los GM-Mφs tratados con C-DIM12 o IP7e.** La secreción de las citocinas asociadas al fenotipo M1 (Activina A, TNF e IL-1β) y de las citocinas relacionadas al fenotipo M2 (IL-10 y CCL2) se evaluó en los sobrenadantes de los GM-Mφs tratados previamente con C-DIM12 (1 y 10 μM), IP7e (1 y 10 μM) o DMSO durante 4 h mediante la técnica de ELISA. (n = 5; \*, p < 0.05; \*\*\*, p < 0.0005).

### 8.5. Nurr1 en la funcionalidad de los GM-Mφs: regulador negativo de la función inflamatoria y de la producción de especies reactivas de oxígeno

Funcionalmente, los GM-Mφs pre-tratados con los agonistas de Nurr1 y expuestos a LPS disminuyeron significativamente la cantidad de transcritos que codifican para citocinas pro-inflamatorias, tales como *IL6* (con ambos agonistas), e *IL1B*, *IL12*, e *IFNB* (con C-DIM12) (**Figura 23**). Además, estos resultados se vieron reflejados a nivel de proteína. Los GM-Mφs activados con LPS secretaron menores niveles de IL-6, IL-1β, IL-12p40, e IFN-β cuando fueron pre-tratados con C-DIM12 o IP7e comparado con las condiciones control. La concentración más alta utilizada de IP7e indujo además una profunda supresión de la secreción de TNF, IL-8, CCL2 e IL-10 (**Figura 24**).



**Figura 23. Los agonistas de Nurr1 disminuyen la transcripción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a LPS.** Los GM-Mφs fueron pre-tratados con C-DIM12 (10 μM) (A), IP7e (10 μM) (B), o DMSO durante 4 h, y luego activados con LPS por 1 h. La expresión de los transcritos evaluados se analizó mediante RT-qPCR. (n = 2–12; \*, p < 0.05, \*\*, p < 0.005).

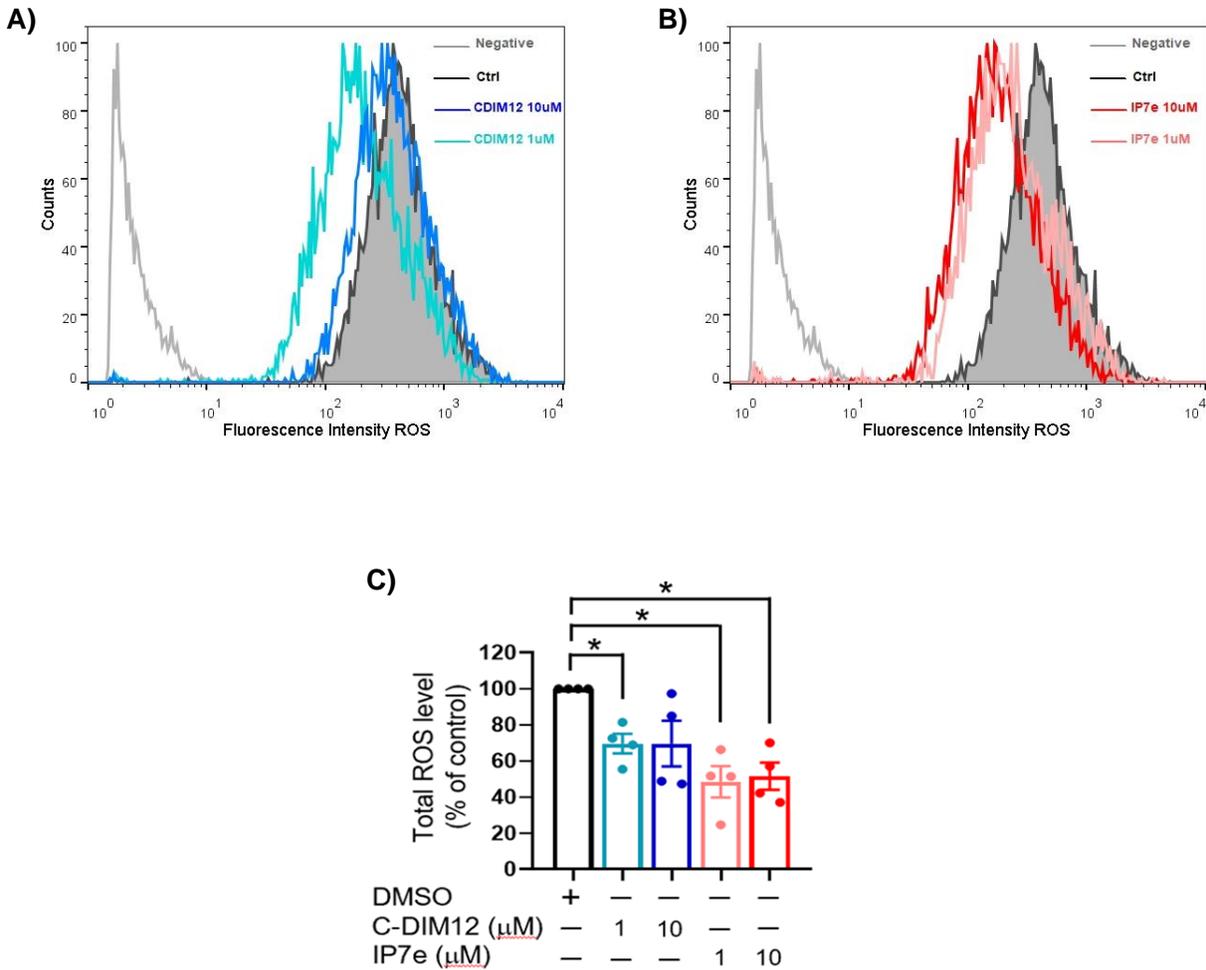


**Figura 24. La activación de Nurr1 atenúa la respuesta inflamatoria de los GM-Mφs.** Los GM-Mφs fueron pre-tratados con C-DIM12 (1 o 10 μM), IP7e (1 o 10 μM), o DMSO durante 4 h y luego activados con LPS por 18 h. La secreción de las citocinas/quimiocinas indicadas se evaluó mediante la técnica de ELISA en el sobrenadante de los cultivos celulares. (n = 3–7; \*, p < 0.05, \*\*, p < 0.005, \*\*\*, p < 0.0005).

La actividad de Nurr1 ha sido asociada con tres características principales de los Mφs, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la captación de lípidos oxidados, y la fagocitosis.

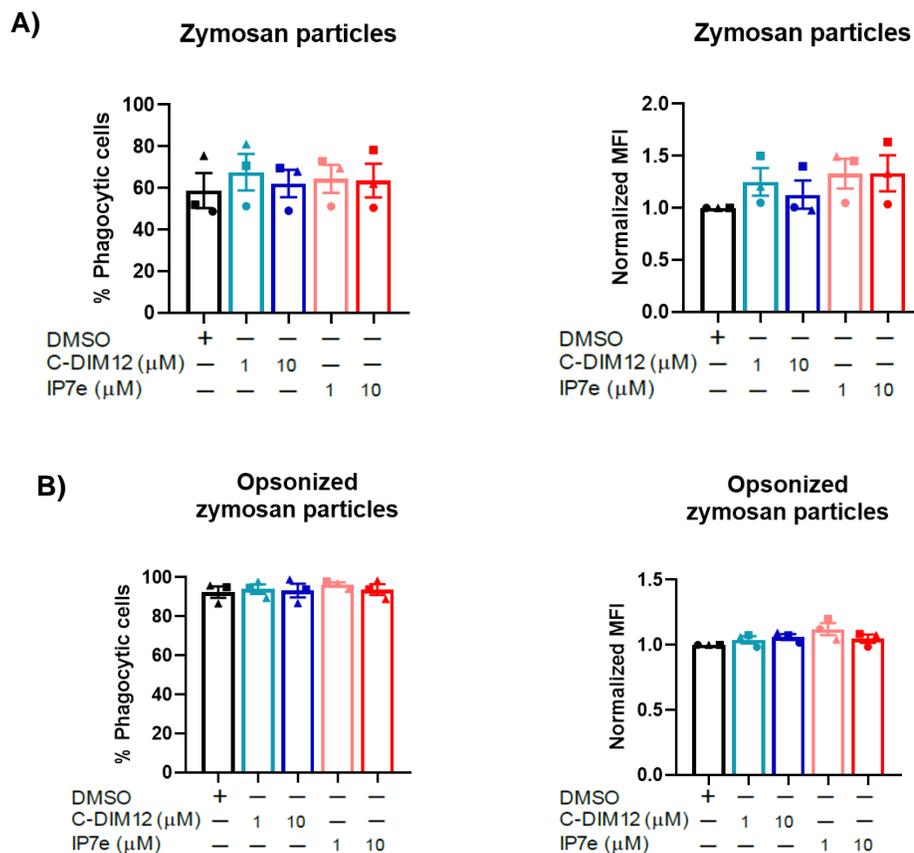
En cuanto a la producción ROS, se ha reportado que Nurr1 suprime la expresión de una enzima clave en la síntesis de ROS codificada por el gen *NCF1* (157). La producción de especies reactivas de oxígeno fue evaluada mediante el tratamiento de los GM-Mφs con

PMA/ionomicina. Los niveles generados de ROS se redujeron cuando las células fueron pretratadas con los agonistas de Nurr1 C-DIM12 o IP7e (**Figura 25**).



**Figura 25. La activación de Nurr1 con C-DIM12 o IP7e disminuye la producción de ROS en los GM-M $\phi$ s.** Los GM-M $\phi$ s fueron pre-tratados con C-DIM12 (1 o 10  $\mu\text{M}$ ), IP7e (1 o 10  $\mu\text{M}$ ), o DMSO durante 4 h y luego estimulados con PMA/ionomicina durante 1 h. Los niveles totales de ROS fueron evaluados mediante citometría de flujo empleando una sonda fluorescente para su detección. (A-B) Histogramas representativos de la producción de ROS en los GM-M $\phi$ s pre-tratados con C-DIM12 (A) o IP7e (B). (C) Gráfica de la producción total de ROS (n = 4, \*, p < 0.05).

En cuanto a la actividad fagocítica, previamente se ha reportado que la activación de Nurr1 disminuye la actividad fagocítica en células BV-2 de microglía de ratón (172). Para evaluar la capacidad fagocítica, los GM-M $\phi$ s fueron cultivados con partículas de zymosan-FITC (5 partículas/célula) sin opsonizar u opsonizadas con suero humano fresco por 1-2 h a 37°C. La fagocitosis se detuvo lavando las células con PBS frío con 0.1% de BSA y 0.01% azida de sodio. Posteriormente las muestras fueron evaluadas mediante citometría de flujo. El tratamiento con los agonistas de Nurr1 no alteró la capacidad fagocítica de los GM-M $\phi$ s en ninguna de las condiciones evaluadas (**Figura 26**).



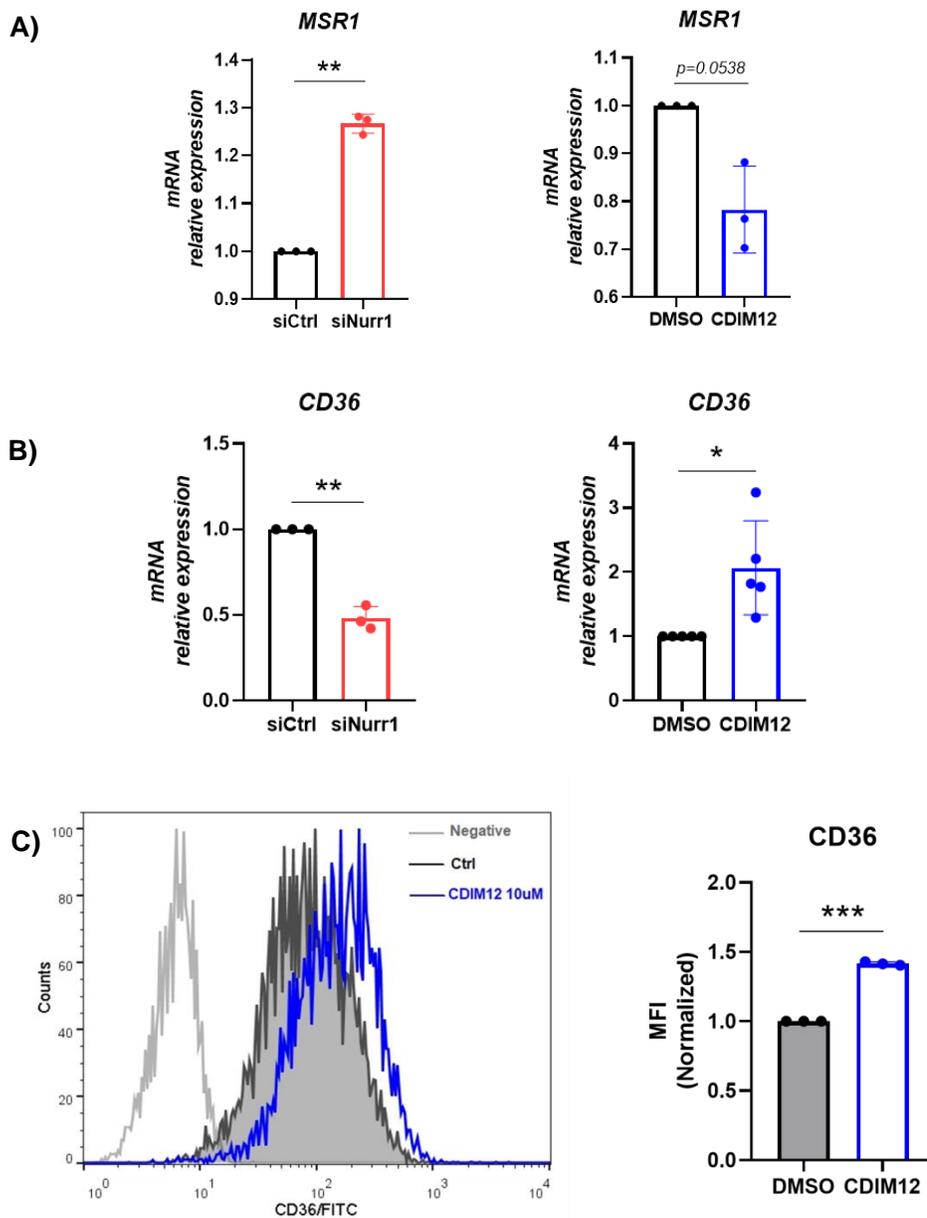
**Figura 26. La activación de Nurr1 no altera la capacidad fagocítica de los GM-M $\phi$ s.** Los GM-M $\phi$ s fueron pre-tratados con C-DIM12 (1 o 10  $\mu$ M), IP7e (1 o 10  $\mu$ M), o DMSO durante 4 h y luego cultivados con partículas de zymosan-FITC (5 partículas/célula) sin opsonizar (A) u opsonizadas con suero humano fresco por 1-2 h a 37°C (B). Se muestran las gráficas del % de células fagocíticas (izquierda), así como de la intensidad media de fluorescencia (MFI, derecha) relativa a la obtenida en los M $\phi$  tratados con DMSO. Media  $\pm$  SEM (n = 3).

Por otro lado, se ha descrito que la sobreexpresión de Nurr1 en células THP-1 disminuye la expresión de los receptores scavenger SR-A y CD36, así como la captación de lípidos oxidados (162). Por ello en este estudio decidimos evaluar la expresión de los transcritos que codifican SR-A (*MSR1*) y *CD36* en GM-Mφs deficientes de Nurr1 y en GM-Mφs tratados con el agonista C-DIM12. En concordancia con lo previamente descrito, los GM-Mφs deficientes de Nurr1 presentaron un ligero aumento en la expresión del mRNA de *MSR1* mientras que los GM-Mφs tratados con C-DIM12 presentaron una ligera disminución en la expresión de este gen (**Figura 27 A**). De manera interesante, al evaluar el mRNA de *CD36* encontramos lo contrario, una disminución de su expresión tras el silenciamiento de Nurr1 y un aumento tras el tratamiento con el agonista (**Figura 27 B**). Posteriormente decidimos evaluar la expresión en membrana de CD36 en GM-Mφs estimulados con C-DIM12 durante 24 h, mediante citometría de flujo. En concordancia con los resultados previamente observados a nivel de mRNA, el tratamiento de los GM-Mφs con C-DIM12 aumento la expresión del receptor scavenger CD36 (**Figura 27 C**).

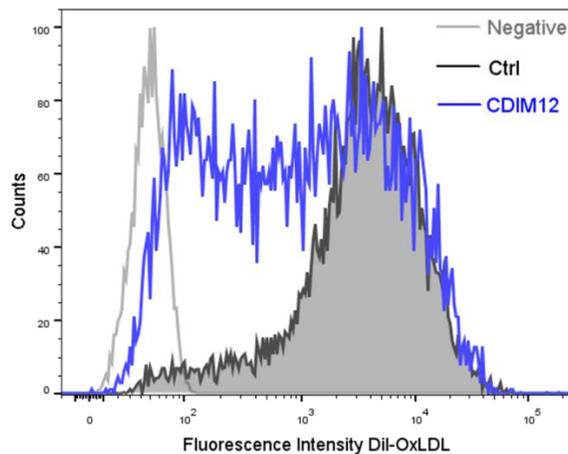
Finalmente, se evaluó la captación de lípidos oxidados en las células en respuesta a la activación de Nurr1. Se realizó un ensayo preliminar donde los GM-Mφs fueron pre-tratados con el agonista de Nurr1 C-DIM12 durante 24 h y luego fueron cultivados en presencia del reactivo Dil-oxLDL por 4 h. Concluido este tiempo se recuperaron las células y se evaluó la captación de Dil-oxLDL mediante citometría de flujo. En los dos donantes evaluados la activación de Nurr1 con el agonista disminuyó la internalización de oxLDL (**Figura 28**), lo cual concuerda con lo previamente reportado en células THP-1 tras la sobreexpresión de Nurr1 (162). Sin embargo, éste sólo es un resultado preliminar y tiene que ser corroborado en otros donantes.

En resumen, los hallazgos encontrados respecto a la funcionalidad de Nurr1 en los GM-Mφs indican que la activación de Nurr1 en estos Mφs induce una disminución de su perfil pro-inflamatorio. Además, Nurr1 regula negativamente las capacidades citotóxicas de los GM-Mφs en términos de la producción de ROS. La activación de Nurr1 también modifica la expresión de al menos dos receptores involucrados en la captación de lípidos oxidados

(*MSR1* y *CD36*) en sentido inverso, aunque el efecto neto parece relacionarse con una menor internalización de dichos lípidos.



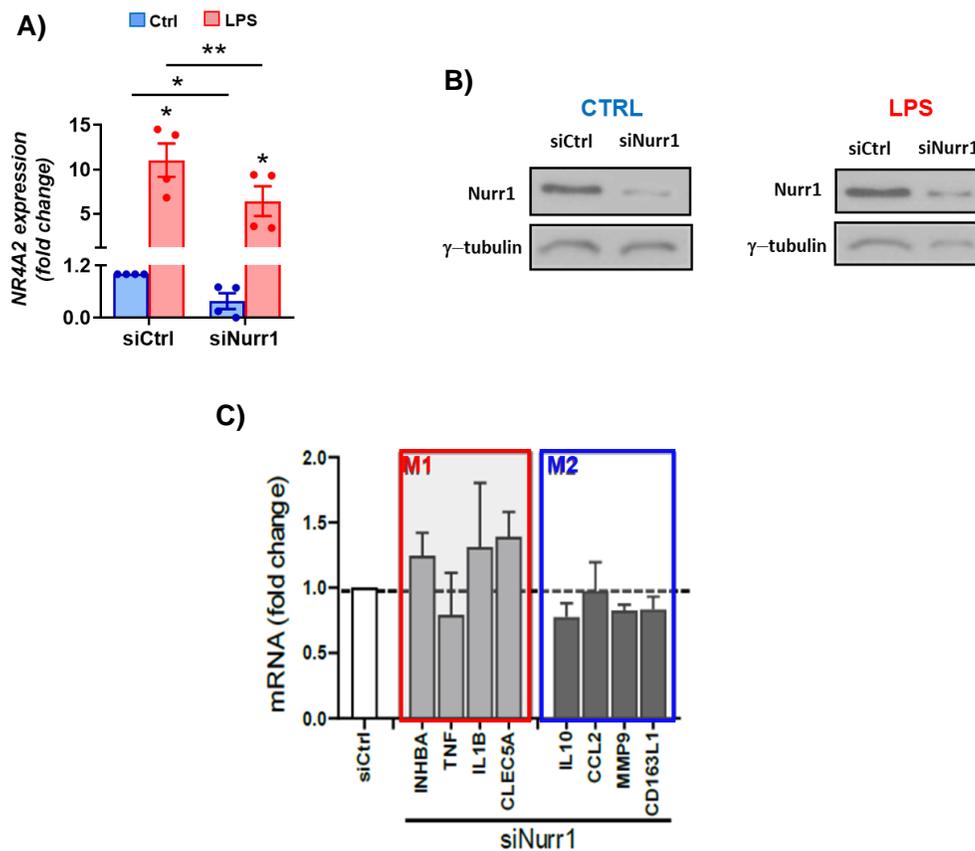
**Figura 27. Expresión de *MSR1* y *CD36* tras la activación o el silenciamiento de Nurr1.** (A-B) Los GM-M $\phi$ s fueron transfectados con un siRNA control (siCtrl) o con un siRNA específico de Nurr1 (siNurr1), o fueron pre-tratados con C-DIM12 (10  $\mu$ M) o DMSO durante 4 h. La expresión de *MSR1* y *CD36* se analizó mediante RT-qPCR. (C) Expresión de *CD36* de membrana en GM-M $\phi$ s tratados durante 24 h con C-DIM12 10  $\mu$ M o DMSO. Los niveles totales de *CD36* fueron evaluados mediante citometría de flujo empleando un Ab monoclonal anti-*CD36* y un Ab secundario acoplado a FITC para su detección. (n = 3–5; \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.005$ , \*\*\*,  $p < 0.0005$ ).



**Figura 28. Captación de lípidos oxidados tras la activación de Nurr1.** Los GM-M $\phi$ s fueron pre-tratados con DMSO o C-DIM12 (10  $\mu$ M) durante 24 h. Posterior a este tiempo los M $\phi$ s fueron cultivados con el reactivo Dil Ox-LDL (5 mg/mL) por 4 h. Concluido este tiempo se recuperaron las células y se evaluó la captación de Dil-oxLDL mediante citometría de flujo.

### 8.6. El silenciamiento de Nurr1 promueve el perfil pro-inflamatorio de los GM-M $\phi$ s

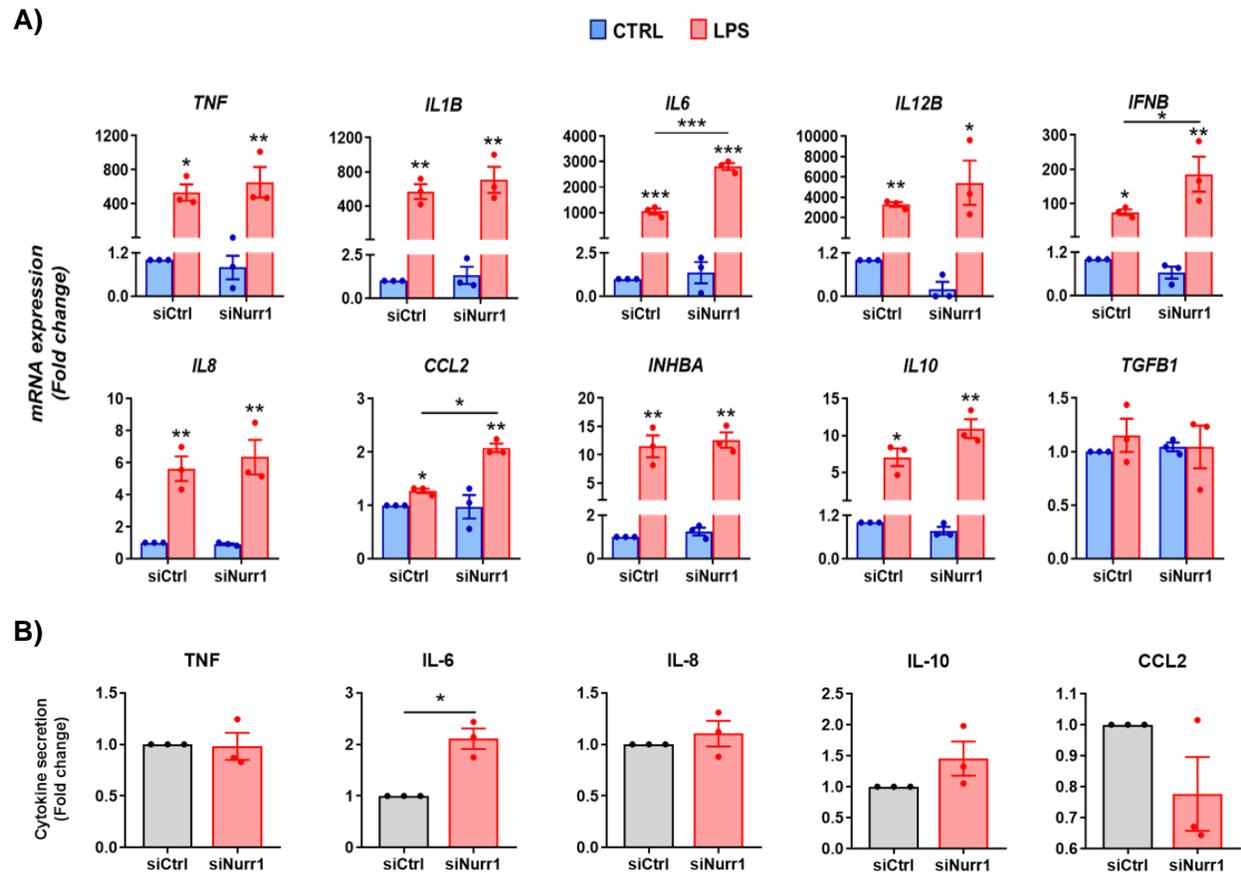
Además de su papel como agonistas de Nurr1, se ha demostrado que C-DIM12 e IP7e ejercen actividades independientes de Nurr1 (173). Por lo tanto, para corroborar los resultados anteriores, generamos M $\phi$ s deficientes de Nurr1. Los niveles endógenos del mRNA *NR4A2* disminuyeron en más de un 60% en los M $\phi$ s transfectados con un siRNA específico para Nurr1 (siNurr1) en comparación con el siRNA control (siCtrl) (**Figura 29A**), y esto se reflejó a nivel de proteína (**Figura 29B**). Los niveles de mRNA de *NR4A2* también disminuyeron en más de un 40% en los M $\phi$ s tratados con el siNurr1 y activados con LPS (**Figura 29A**), al igual que la cantidad de proteína (**Figura 29B**). Los GM-M $\phi$ s deficientes de Nurr1 no modificaron de manera sustancial la expresión de los marcadores asociados a la polarización M1 o M2 (**Figura 29C**).



**Figura 29. El silenciamiento de Nurr1 no altera de manera global el estado de polarización de los GM-M $\phi$ .** Los GM-M $\phi$ s fueron transfectados con un siRNA control (siCtrl) o un siRNA específico contra Nurr1 (siNurr1), y luego dejados sin tratar (CTRL) o estimulados con LPS durante 2 o 12 h. (A) Niveles del transcrito *NR4A2* en los GM-M $\phi$ s Ctrl o activados con LPS durante 2 h (n = 3; \*, p < 0.05, \*\*, p < 0.005). (B) Western blot representativo del silenciamiento de Nurr1 en los GM-M $\phi$ s Ctrl o activados con LPS por 2 h. (C) Expresión de los marcadores asociados a la polarización M1 (*INHBA*, *TNF*, *IL1B*, *CLEC5A*) y M2 (*IL10*, *CCL2*, *MMP9*, *CD163L1*), evaluada mediante RT-qPCR. Los valores están referenciados a aquellos obtenidos en los GM-M $\phi$ s transfectados con el siCtrl (n = 3).

Sin embargo, el silenciamiento de Nurr1 tuvo un impacto en la respuesta inflamatoria de los GM-M $\phi$ s activados con LPS. Entre las citocinas y quimiocinas evaluadas, los GM-M $\phi$ s deficientes de Nurr1 potenciaron significativamente los niveles de los transcritos *IL6*, *IFNB*, y *CCL2* con respecto a las células transfectadas con el siCtrl (**Figura 30A**). El incremento en el mRNA de *IL6* se acompañó de un aumento significativo en la secreción de la proteína (**Figura 30B**). En conjunto, estos datos confirman que Nurr1 controla hasta

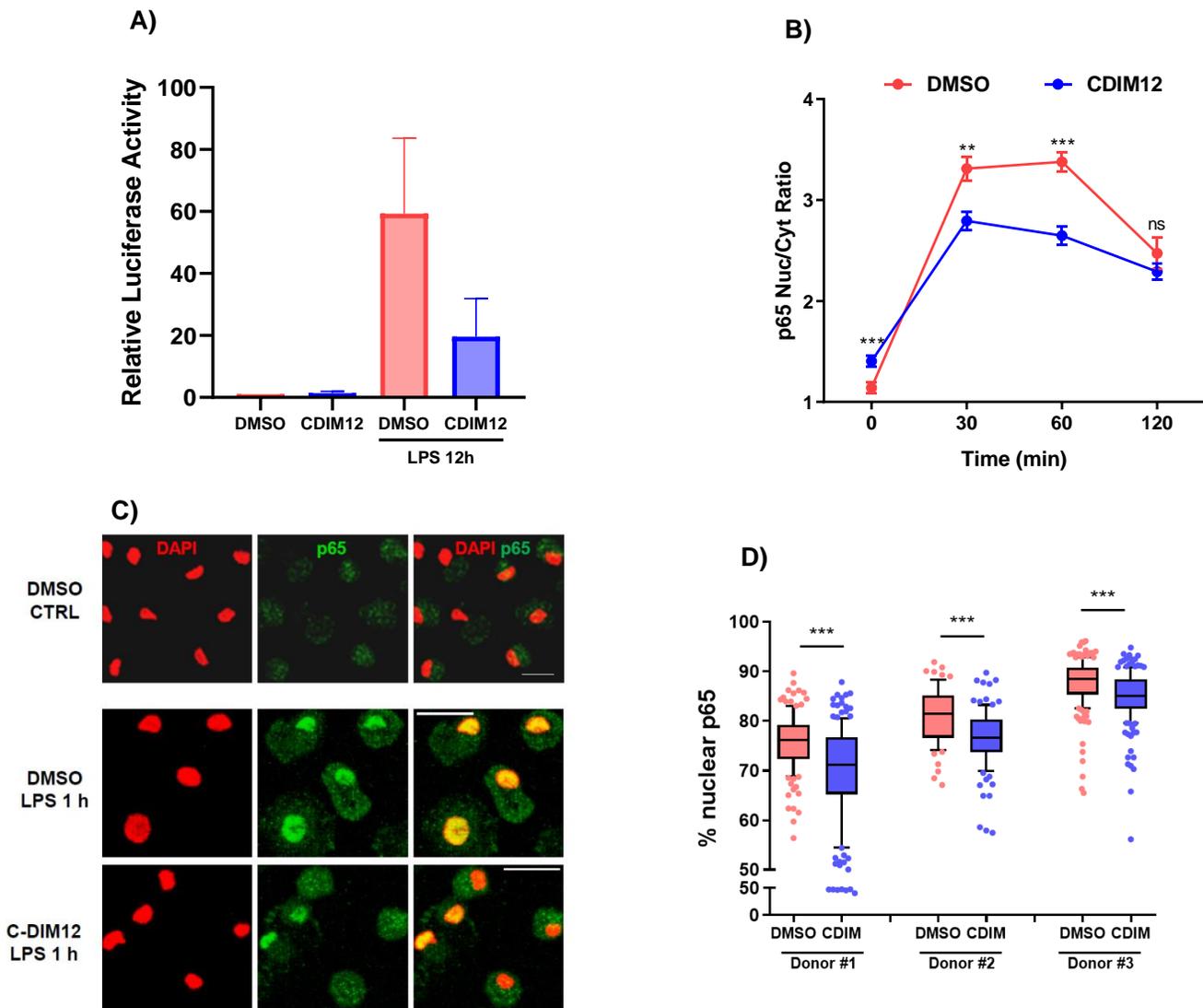
cierto punto el perfil inflamatorio de los M $\phi$ s humanos primarios sin afectar su estado de polarización global.



**Figura 30. El silenciamiento de Nurr1 aumenta la expresión de factores pro-inflamatorios en los GM-M $\phi$ s en respuesta a LPS.** Los GM-M $\phi$ s fueron transfectados con un siRNA control (siCtrl) o un siRNA específico contra Nurr1 (siNurr1), y luego dejados sin tratar (CTRL) o estimulados con LPS durante 2 o 12 h. (A) Cuantificación del mRNA de la citocinas y quimiocinas indicadas en los GM-M $\phi$ s Ctrl y los estimulados con LPS por 2 h, transfectados con el siCtrl o con el siNurr1. Se muestran los valores relativos a aquellos obtenidos en los GM-M $\phi$ s Ctrl transfectados con el siCtrl ( $n = 3$ ;  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ ). (B) Determinación de los niveles de secreción de las citocinas indicadas en los sobrenadantes de los GM-M $\phi$ s transfectados con el siCtrl o con el siNurr1 y activados con LPS por 2 h (TNF, IL-6, IL-8) o 12 h (IL-10, CCL2). Se muestran los valores relativos a los obtenidos en los GM-M $\phi$ s transfectados con el siCtrl ( $n = 3$ ; \*,  $p < 0.05$ ).

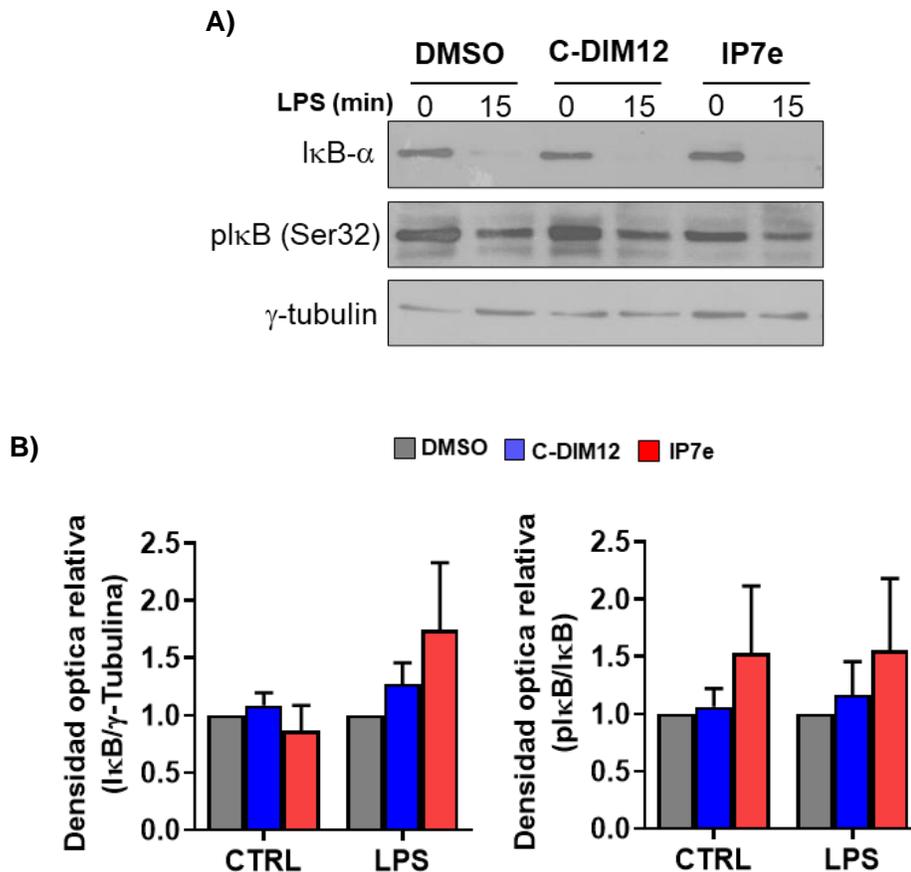
### 8.7. La activación de Nurr1 afecta la vía de señalización de NF- $\kappa$ B en los GM-M $\phi$ estimulados con LPS.

Se ha reportado que la función antiinflamatoria de Nurr1 es mediada por una inhibición de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B (147, 157). Nosotros decidimos evaluar si la activación de Nurr1 en los GM-M $\phi$ s afectaba esta vía en las células estimuladas con LPS. Primero, nosotros determinamos la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en los GM-M $\phi$ s activados con LPS transfectando las células con un plásmido reportero con el gen de la luciferasa *firefly* bajo el control de elementos de respuesta  $\kappa$ B dispuestos en tándem. Comparado con las células control, la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B se incrementó de manera significativa en las células estimuladas con LPS (**Figura 31A**). Sin embargo, cuando las células fueron pretratadas con el agonista de Nurr1 C-DIM12 durante 4 h, la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en respuesta a LPS se redujo (**Figura 31A**). Esta disminución estuvo en concordancia con la disminución en la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B, evaluada mediante inmunofluorescencia (**Figura 31B-D**) y Western blot (datos no mostrados). La disminución en los niveles de p65 nuclear se detectó en los GM-M $\phi$ s tratados con C-DIM12 o IP7e, aunque la reducción observada fue significativa únicamente tras el tratamiento con C-DIM12 (**Figura 31B-D**). De manera interesante, en ausencia de LPS ambos agonistas incrementaron la cantidad de p65 nuclear con respecto a las células control (**Figura 31B**).



**Figura 31. La activación de Nurr1 previene la activación de la vía de NF- $\kappa$ B en células activadas con LPS.** Los GM-M $\phi$ s pre-tratados con C-DIM12 10  $\mu$ M o DMSO durante 4 h fueron estimulados o no con LPS (100 ng/mL) por 12 h. (A) Actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en los GM-M $\phi$ s. Se muestra la actividad de la luciferasa *firefly* dependiente de NF- $\kappa$ B relativa a la actividad de la luciferasa *Renilla* (n = 5). (B) Cinética de translocación nuclear de NF- $\kappa$ B p65 en GM-M $\phi$ s control o activados con LPS a los tiempos indicados. Los GM-M $\phi$ s fueron pre-tratados con C-DIM12 (10  $\mu$ M) o DMSO durante 2 h. Se muestra la cuantificación de la relación núcleo/citoplasma de la intensidad de fluorescencia relativa (RFI) de NF- $\kappa$ B p65 evaluada mediante microscopía Confocal. (C) Imágenes representativas de la localización nuclear de NF- $\kappa$ B p65 en GM-M $\phi$ s control o activados con LPS por 1 h, pre-tratados con C-DIM12 o DMSO por 2 h. Imágenes de microscopía Confocal mostrando la tinción del núcleo (DAPI, rojo), p65 (verde) y el merge (DAPI/p65, yellow). Barra de escala, 25  $\mu$ m. (D) Cuantificación de la RFI de NF- $\kappa$ B p65 nuclear, expresada como porcentaje de la RFI total de p65, en GM-M $\phi$ s de tres donantes distintos activados con LPS. Los diagramas de caja y bigotes muestran los percentiles 10-90 en los bigotes, los percentiles 25-75 en las cajas y la mediana en la línea horizontal.

Debido a los resultados mostrados anteriormente decidimos investigar si la activación de Nurr1 afectaba la expresión o estabilidad de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ . Ni C-DIM12 ni IP7e parecen modular la estabilidad de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  ya que no modificaron de manera significativa ni la fosforilación ni la degradación de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  en las células estimuladas con LPS (**Figura 32A y B**).



**Figura 32 La activación de Nurr1 no modifica la estabilidad de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ .** Degradación y fosforilación de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  en GM-M $\phi$ s pre-tratados por 2 h con C-DIM12 (10  $\mu\text{M}$ ), IP7e (10  $\mu\text{M}$ ) o DMSO, y luego expuestos a LPS (100 ng/mL) por 15 min. (A) Western blot representativo de la expresión de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  total y fosforilado en la Serina 32 (pIκB-Ser32). (B) Graficas de la cuantificación de la expresión de  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  total (izquierda) y pIκB-Ser32 (derecha). Los valores están referenciados a aquellos obtenidos en los GM-M $\phi$ s tratados con DMSO (n = 4).

## IX. DISCUSIÓN

Los M $\phi$ s son células del sistema inmune innato con una elevada plasticidad capaces de adquirir diferentes características morfológicas y fisiológicas dependiendo del tipo de tejido y del microambiente inmunológico (16, 33). En respuesta a la infección o al daño tisular los monocitos son reclutados y se diferencian a M $\phi$ s, que se adaptan inicialmente al microambiente inflamatorio (174). Tras un periodo agudo de inflamación se produce un cambio en el fenotipo de estos M $\phi$ s inflamatorios a M $\phi$ s con un perfil anti-inflamatorio (13, 175). 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. En este contexto, los M $\phi$ s cuentan con diferentes estrategias para desactivar su propia producción de mediadores inflamatorios cuyas acciones pueden ser perjudiciales si se prolongan en el tiempo. En este trabajo describimos el rol del receptor nuclear Nurr1 como un factor limitante de la respuesta inflamatoria en los M $\phi$ s humanos. De manera inicial encontramos una expresión preferencial de este factor de transcripción en los M $\phi$ s con un perfil pro-inflamatorio (GM-M $\phi$ s) en comparación con los M-M $\phi$ s los cuales se asemejan a los M $\phi$ s residentes de tejido u homeostáticos (47, 48). Además, la expresión de Nurr1 fue inducida por varios estímulos inflamatorios, una característica común a otros factores que contrarrestan la inflamación (176). Los GM-M $\phi$ s expresaron mayores niveles de la proteína Nurr1 incluso cuando estas células sintetizaron menores niveles del mRNA *NR4A2* con respecto a los M-M $\phi$ s, lo que sugiere una regulación postranscripcional diferencial de Nurr1 en los GM-M $\phi$ s y M-M $\phi$ s. En ese sentido, se ha descrito que los microRNAs (miRNAs) miR-132 y miR-145-5p inhiben postranscripcionalmente la traducción de Nurr1 (177-179). Por lo tanto, la regulación diferencial de estos miRNAs en GM-M $\phi$ s y M-M $\phi$ s puede ser la base de la diferencia en la cantidad de transcritos de *NR4A2* y Nurr1 a nivel de proteína mostrada por estos subtipos celulares.

El gen *NR4A2* es un gen de respuesta inmediata temprana que se transcribe rápidamente en respuesta a la activación de TLRs y otros estímulos inflamatorios (141, 160, 165, 180, 181). Se ha demostrado la inducción temprana (1 h) de la expresión del mRNA de *NR4A2* en la línea celular mielomonocítica humana THP-1 tras la activación con LPS (160). Por el contrario, la inducción de la expresión del gen *NR4A2* en los GM-Mφs estimulados por ligandos de los TLRs fue relativamente lenta, alcanzando su punto máximo a las 4 h. El aumento en la transcripción del gen *NR4A2* tras la estimulación con poli (I:C) en comparación con la obtenida con PGN sugiere que la vía de señalización independiente de MyD88 indujo la expresión del mRNA de *NR4A2* de manera más eficiente (182). Numerosos estudios apuntan a la vía de señalización NF-κB como la principal mediadora de la expresión de los receptores NR4A (183). La región promotora de Nurr1 en humano y en ratón contienen elementos de respuesta conservados a NF-κB y CREB, y su unión a estos sitios se ha demostrado en sinoviocitos humanos activados con TNF o IL-1β (κB) y PGE2 (CRE) (184). En nuestro sistema celular, la inducción de la transcripción del gen *NR4A2* en los GM-Mφs activados con LPS se redujo tras el bloqueo de las vías de NF-κB y p38.

Previamente se ha reportado que la sobreexpresión de Nurr1 en Mφs derivados de médula ósea de ratón induce un aumento en la expresión de genes asociados con el fenotipo M2 (arginasa 1, Ym1, receptor de manosa), así como una disminución en la expresión de genes relacionados con la polarización M1 (TNF, IL-12, CXCL9) y un aumento en la secreción de IL-10 (165). En nuestro estudio, ni la activación, ni el silenciamiento de Nurr1 afectaron de manera significativa la expresión de los genes asociados con el fenotipo pro-inflamatorio o anti-inflamatorio de los GM-Mφs y M-Mφs, respectivamente. Sin embargo, observamos una supresión en la transcripción de genes de citocinas pro-inflamatorias, específicamente *IL1B*, *IL6*, *IL12B* e *IFNB*, en los GM-Mφs estimulados con LPS tras la activación de Nurr1 con C-DIM12. La disminución en la producción de estas citocinas se verificó a nivel de proteína. El agonista IP7e mostró mayores efectos que C-DIM12, disminuyendo la producción de todas las citocinas y quimiocinas evaluadas, es decir, TNF, IL-1β, IL-6, IL-12 p40, IL-

8, IL-10, CCL2 e IFN- $\beta$ . Aunque las concentraciones evaluadas de IP7e no mostraron efectos citotóxicos sobre los GM-M $\phi$ s (datos no mostrados), una supresión generalizada de la función de los M $\phi$ s podría ser la causa de la reducción general de la secreción de citocinas, incluida la citocina anti-inflamatoria IL-10, inducida por IP7e en células estimuladas con LPS. Sin embargo, estos datos son consistentes con el mayor efecto como activador de Nurr1 mostrado por IP7e en comparación con C-DIM12 en células epiteliales pigmentarias de la retina que sobre-expresaban Nurr1 (185). Además, se ha demostrado que la activación de Nurr1 con diferentes agonistas derivados de bis-indol y quinolina depende de la estructura, el contexto celular y el gen (186), por lo que parece razonable que C-DIM12 e IP7e puedan tener diferente potencia e incluso regular distintos grupos de genes. Un factor adicional que hace la función de Nurr1 más compleja es que este ejerce efectos de manera dependiente de la concentración. Nurr1 regula diferentes grupos de genes de manera dependiente de su abundancia, y para algunos transcritos relacionados con el sistema inmunológico incluso se detectan cambios bidireccionales (p. ej., *IL1B*, *IL8*, *CSF2*, *CCL5*, *CCL7*, *CCL20*, entre otros) (167, 187), lo que puede explicar las funciones pro-inflamatorias y anti-inflamatorias de Nurr1 descritas en diferentes contextos celulares (149, 165, 188, 189).

Además del papel de Nurr1 como un regulador negativo de la respuesta inflamatoria en los GM-M $\phi$ s, nuestros hallazgos refuerzan el rol previamente descrito de Nurr1 en dos actividades fundamentales del M $\phi$ , como lo son la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), y la captación de lípidos oxidados. En cuanto a la producción ROS, se ha reportado que Nurr1 suprime la expresión de la enzima *NCF1* (subunidad p47-phox del complejo NADPH oxidasa), la cual es clave en la síntesis de ROS (157). La disminución encontrada en la producción de ROS en los GM-M $\phi$ s tras el empleo de los agonistas C-DIM12 e IP7e indican que Nurr1 podría actuar como un regulador negativo de la función citotóxica de estas células. En cuanto a la captación de lípidos oxidados, previamente se ha descrito la expresión de Nurr1 en M $\phi$ s de lesiones ateroscleróticas, y su sobreexpresión en células THP-1 induce una

disminución en la captación de lípidos oxidados, así como una regulación a la baja de los transcritos que codifican para los receptores scavenger *MSR1* y *CD36* (162). En este sentido, a pesar del aumento observado en este trabajo en los niveles de expresión en membrana de CD36 mediados por la activación de Nurr1, los hallazgos encontrados en este estudio en la disminución de la captación de lípidos oxidados en los GM-Mφs tras la activación con el agonista C-DIM12 refuerzan el papel de Nurr1 como un regulador negativo de la captación de lípidos por parte de los Mφs, actividad que podría funcionar como una vía de regulación negativa para la formación de células espumosas, y sugieren un efecto protector de Nurr1 frente al desarrollo de aterosclerosis.

En este trabajo hemos mostrado que el tratamiento de los GM-Mφs con C-DIM12 aumenta la expresión de Nurr1 de manera significativa, mientras que el tratamiento con IP7e no, por lo cual, algunos efectos diferenciales de estos agonistas también podrían estar relacionados con la abundancia de Nurr1. La regulación de la expresión de *IL6*, *CCL2* e *IFNB* por parte de los agonistas de Nurr1 se confirmó en los Mφs deficientes en Nurr1, lo que confirma a Nurr1 como un regulador transcripcional de la expresión de estos genes.

También se ha demostrado el efecto sobre la expresión de IL-6 y CCL2 en fibroblastos sinoviales activados por TNF- $\alpha$  tras el silenciamiento de Nurr1 (190). En el caso de *IL6* y *CCL2*, cuya expresión está regulada por NF- $\kappa$ B, no se han identificado sitios NBRE en sus promotores y Nurr1 no requiere unión al DNA para reprimir su expresión (191), por lo que mecanismos de transrepresión a través de la interacción proteína-proteína deben impulsar su regulación negativa. En ese sentido, se han descrito distintos mecanismos inhibitorios de Nurr1 sobre la vía de NF- $\kappa$ B. En varios reportes se ha demostrado la interacción de Nurr1 con NF- $\kappa$ B p65 (192-194), y se ha sugerido que C-DIM12 promueve esta interacción (193). La formación de dichos complejos da lugar a la inhibición de la translocación nuclear de p65 (193, 194) o al reclutamiento de complejos proteicos corepresores en los elementos de respuesta  $\kappa$ B sin impedir la translocación de p65, resultando en ambos casos en la inhibición transcripcional de

NF- $\kappa$ B (147, 157). De manera adicional se ha descrito que C-DIM12 disminuye la expresión de I $\kappa$ B- $\alpha$  y de p65 en fibroblastos sinoviales (190). En este estudio encontramos que C-DIM12 disminuyó la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, así como la translocación nuclear de p65 en los GM-M $\phi$ s activados con LPS, sin afectar la expresión o degradación de I $\kappa$ B. Esta misma tendencia fue observada con IP7e. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la inhibición de la expresión de ciertos genes inflamatorios (ej: *IL6*, *CCL2*) causada por la activación de Nurr1 con C-DIM12 podría deberse a una inhibición del acceso de NF- $\kappa$ B p65 a sus genes blanco en el núcleo.

En conclusión, los miembros de la familia de receptores nucleares NR4A regulan tanto de manera positiva como de manera negativa los genes pro-inflamatorios en diferentes contextos celulares (162, 188, 195), por lo que es imperativo evaluar la función endógena de estos receptores, cuya actividad podría estar fuertemente relacionada con su expresión en un tipo de célula o en un microambiente de citocinas particular. En conjunto, nuestro estudio proporciona información sobre la expresión, la localización subcelular y la regulación transcripcional de Nurr1 en M $\phi$ s primarios derivados de monocitos humanos. Evidenciamos que Nurr1 no altera globalmente el estado de polarización de los M $\phi$ s pro-inflamatorios *in vitro*, pero revela una potente actividad anti-inflamatoria de Nurr1 en condiciones inflamatorias, lo que podría contribuir a restringir la respuesta inflamatoria en diversas patologías.

## X. CONCLUSIONES

- 1 El receptor nuclear Nurr1 se expresa preferencialmente en los Mφs con un perfil pro-inflamatorio (GM-Mφs) con respecto a los Mφs con características anti-inflamatorias (M-Mφs).
- 2 Los niveles del mRNA *NR4A2* son mayores en los M-Mφs en comparación con los GM-Mφs; sin embargo, este mRNA tiene una vida media más corta en los M-Mφs, lo cual evidencia una regulación post-transcripcional diferencial en ambos fenotipos de Mφs.
- 3 El gen *NR4A2* se induce en los Mφs en respuesta a distintos PAMPs. Su expresión está mediada por la activación de p38 y NF-κB en respuesta a LPS.
- 4 La activación de Nurr1 con sus agonistas C-DIM12 e IP7e tiende a aumentar la expresión del mRNA, así como de la proteína (C-DIM12), de Nurr1, además de aumentar su localización nuclear en los GM-Mφs.
- 5 La activación o el silenciamiento de Nurr1 no modifica de manera global el estado de polarización de los GM-Mφs.
- 6 Los GM-Mφs pre-tratados con los agonistas de Nurr1 y expuestos a LPS disminuyen significativamente la síntesis de las citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1β, IL-12 p40, e IFN-β. Además, la activación de Nurr1 en los GM-Mφs disminuye de manera significativa la producción de ROS. Todo lo anterior indica que el factor de transcripción Nurr1 actúa como un regulador negativo de la función inflamatoria y de las capacidades citotóxicas de los GM-Mφs.

- 7 La activación de Nurr1 en los GM-Mφs modifica la expresión de receptores scavenger relacionados con la internalización de lípidos oxidados y reduce la captación de dichos lípidos, por lo que podría tener un efecto ateroprotector.
- 8 Los efectos anti-inflamatorios de Nurr1 parecen estar mediados en parte por la disminución de la translocación nuclear de p65 y la subsecuente disminución de la actividad transcripcional de NF-κB en respuesta a LPS.

El receptor nuclear Nurr1 se expresa de manera preferencial en los Mφ humanos con un perfil proinflamatorio (GM-Mφ). Su activación en condiciones basales no altera de manera global el estado de polarización de los Mφs. Sin embargo, en condiciones inflamatorias parece inhibir de manera parcial la activación de la vía de NF-κB, restringiendo así la respuesta inflamatoria de estas células.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-69. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
2. Silva MT. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol.* 2010;87(1):93-106. <https://doi.org/10.1189/jlb.0809549>
3. Chow A, Brown BD, Merad M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):788-98. <https://doi.org/10.1038/nri3087>
4. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010;327(5966):656-61. <https://doi.org/10.1126/science.1178331>
5. Auffray C, Fogg DK, Narni-Mancinelli E, Senechal B, Trouillet C, Saederup N, et al. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med.* 2009;206(3):595-606. <https://doi.org/10.1084/jem.20081385>
6. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science.* 2006;311(5757):83-7. <https://doi.org/10.1126/science.1117729>
7. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19(1):71-82. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00174-2)
8. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989;74(7):2527-34. <https://doi.org/10.1182/blood.V74.7.2527.2527>
9. Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol.* 2000;67(5):699-704. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.5.699>
10. Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Schütt C, et al. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol.* 1993;23(9):2053-8. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230902>
11. Anbazhagan K, Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. Transcriptomic network support distinct roles of classical and non-classical monocytes in human. *Int Rev Immunol.* 2014;33(6):470-89. <https://doi.org/10.3109/08830185.2014.902453>
12. Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol.* 2004;172(7):4410-7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.4410>
13. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory

macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007;204(5):1057-69. <https://doi.org/10.1084/jem.20070075>

14. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007;317(5838):666-70. <https://doi.org/10.1126/science.1142883>

15. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007;204(12):3037-47. <https://doi.org/10.1084/jem.20070885>

16. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):723-37. <https://doi.org/10.1038/nri3073>

17. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* 2007;10(12):1538-43. <https://doi.org/10.1038/nn2014>

18. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 2010;330(6005):841-5. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>

19. Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, et al. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci.* 2007;10(12):1544-53. <https://doi.org/10.1038/nn2015>

20. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science.* 2011;332(6035):1284-8. <https://doi.org/10.1126/science.1204351>

21. Bigley V, Haniffa M, Doulatov S, Wang XN, Dickinson R, McGovern N, et al. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J Exp Med.* 2011;208(2):227-34. <https://doi.org/10.1084/jem.20101459>

22. Hambleton S, Salem S, Bustamante J, Bigley V, Boisson-Dupuis S, Azevedo J, et al. IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N Engl J Med.* 2011;365(2):127-38. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1100066>

23. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity.* 2013;38(4):792-804. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>

24. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science.* 2012;336(6077):86-90. <https://doi.org/10.1126/science.1219179>

25. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity.* 2013;38(1):79-91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>

26. Davies LC, Rosas M, Jenkins SJ, Liao CT, Scurr MJ, Brombacher F, et al. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat Commun.* 2013;4:1886. <https://doi.org/10.1038/ncomms2877>
27. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 2013;14(10):986-95. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>
28. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity.* 2014;41(1):21-35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>
29. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677-86. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
30. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13. <https://doi.org/10.12703/p6-13>
31. Biswas SK, Chittezhath M, Shalova IN, Lim JY. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res.* 2012;53(1-3):11-24. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8291-9>
32. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425-40. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
33. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-95. <https://doi.org/10.1172/jci59643>
34. Castoldi A, Naffah de Souza C, Câmara NO, Moraes-Vieira PM. The Macrophage Switch in Obesity Development. *Front Immunol.* 2015;6:637. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00637>
35. Chinetti-Gbaguidi G, Colin S, Staels B. Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(1):10-7. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.173>
36. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* 2012;33(3):119-26. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.12.001>
37. Tabas I, Bornfeldt KE. Intracellular and Intercellular Aspects of Macrophage Immunometabolism in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2020;126(9):1209-27. <https://doi.org/10.1161/circresaha.119.315939>
38. Udalova IA, Mantovani A, Feldmann M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(8):472-85. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.91>
39. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013;496(7446):445-55. <https://doi.org/10.1038/nature12034>

40. Guiducci C, Vicari AP, Sangaletti S, Trinchieri G, Colombo MP. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res.* 2005;65(8):3437-46. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-4262>
41. Saccani A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, Vago L, et al. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res.* 2006;66(23):11432-40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-1867>
42. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol.* 2005;175(1):342-9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.1.342>
43. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):533-44. <https://doi.org/10.1038/nri2356>
44. Hamilton JA, Achuthan A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends Immunol.* 2013;34(2):81-9. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.08.006>
45. Lenzo JC, Turner AL, Cook AD, Vlahos R, Anderson GP, Reynolds EC, Hamilton JA. Control of macrophage lineage populations by CSF-1 receptor and GM-CSF in homeostasis and inflammation. *Immunol Cell Biol.* 2012;90(4):429-40. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.58>
46. Ushach I, Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol.* 2016;100(3):481-9. <https://doi.org/10.1189/jlb.3ru0316-144r>
47. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(13):4560-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400983101>
48. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol.* 2006;79(2):285-93. <https://doi.org/10.1189/jlb.0105015>
49. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol.* 2011;12(3):231-8. <https://doi.org/10.1038/ni.1990>
50. Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, Scholz GM, et al. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol.* 2012;188(11):5752-65. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103426>
51. Saliba DG, Heger A, Eames HL, Oikonomopoulos S, Teixeira A, Blazek K, et al. IRF5:RelA interaction targets inflammatory genes in macrophages. *Cell Rep.* 2014;8(5):1308-17. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.034>
52. Domínguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Pérez-Maceda B, Gómez-Aguado F, Corcuera MT, et al. Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin expression on M2-

polarized and tumor-associated macrophages is macrophage-CSF dependent and enhanced by tumor-derived IL-6 and IL-10. *J Immunol.* 2011;186(4):2192-200. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000475>

53. Novak U, Harpur AG, Paradiso L, Kanagasundaram V, Jaworowski A, Wilks AF, Hamilton JA. Colony-stimulating factor 1-induced STAT1 and STAT3 activation is accompanied by phosphorylation of Tyk2 in macrophages and Tyk2 and JAK1 in fibroblasts. *Blood.* 1995;86(8):2948-56. <https://doi.org/10.1182/blood.V86.8.2948.2948>

54. Schilling E, Weiss R, Grahert A, Bitar M, Sack U, Hauschildt S. Molecular mechanism of LPS-induced TNF- $\alpha$  biosynthesis in polarized human macrophages. *Mol Immunol.* 2018;93:206-15. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.11.026>

55. Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(5):392-401. <https://doi.org/10.1038/nrm1368>

56. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 2008;132(3):344-62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>

57. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):a001651. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>

58. Sun SC. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Res.* 2011;21(1):71-85. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.177>

59. Sun SC. The non-canonical NF- $\kappa$ B pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(9):545-58. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.52>

60. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-83. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.649>

61. Israël A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(3):a000158. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000158>

62. Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science.* 1993;259(5103):1912-5. <https://doi.org/10.1126/science.8096091>

63. Tam WF, Sen R. IkappaB family members function by different mechanisms. *J Biol Chem.* 2001;276(11):7701-4. <https://doi.org/10.1074/jbc.c000916200>

64. Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene.* 2006;25(51):6706-16. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209933>

65. Wertz IE, Dixit VM. Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(3):a003350. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003350>

66. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(2):95-112. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0215-7>

67. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;388(4):621-5. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.062>
68. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805-20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
69. Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(11):837-48. <https://doi.org/10.1038/nri2423>
70. Ruland J. Return to homeostasis: downregulation of NF-kB responses. *Nat Immunol.* 2011;12(8):709-14. <https://doi.org/10.1038/ni.2055>
71. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023-. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
72. Dejardin E. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(9):1161-79. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.08.007>
73. Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun SC. Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem.* 2004;279(25):26243-50. <https://doi.org/10.1074/jbc.m403286200>
74. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science.* 2001;293(5534):1495-9. <https://doi.org/10.1126/science.1062677>
75. Lin L, Hu X, Zhang H, Hu H. Tertiary Lymphoid Organs in Cancer Immunology: Mechanisms and the New Strategy for Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;10:1398. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01398>
76. van de Pavert SA, Mebius RE. New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(9):664-74. <https://doi.org/10.1038/nri2832>
77. Weih F, Caamaño J. Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway. *Immunol Rev.* 2003;195:91-105. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2003.00064.x>
78. Peng C, Ouyang Y, Lu N, Li N. The NF-kB Signaling Pathway, the Microbiota, and Gastrointestinal Tumorigenesis: Recent Advances. *Front Immunol.* 2020;11:1387. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01387>
79. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science.* 2001;294(5548):1866-70. <https://doi.org/10.1126/science.294.5548.1866>
80. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):685-704. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.2>

81. Ortega-Domínguez B, Herrera-Ramírez M, Tecalco-Cruz AC. Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma. *TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. 2015;18(2):131-43. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.005>
82. Giguère V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev*. 1999;20(5):689-725. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.5.0378>
83. Pascual G, Glass CK. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(8):321-7. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.08.005>
84. Glass CK, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(1):44-55. <https://doi.org/10.1038/nri1748>
85. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*. 2000;14(2):121-41. <http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.14.2.121>
86. McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*. 2002;108(4):465-74. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00641-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00641-4)
87. Hoberg JE, Yeung F, Mayo MW. SMRT derepression by the I $\kappa$ B kinase alpha: a prerequisite to NF- $\kappa$ B transcription and survival. *Mol Cell*. 2004;16(2):245-55. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.010>
88. Ogawa S, Lozach J, Jepsen K, Sawka-Verhelle D, Perissi V, Sasik R, et al. A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(40):14461-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405786101>
89. Perissi V, Aggarwal A, Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell*. 2004;116(4):511-26. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00133-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00133-3)
90. Glass CK, Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(5):365-76. <https://doi.org/10.1038/nri2748>
91. Roshan-Moniri M, Hsing M, Butler MS, Cherkasov A, Rennie PS. Orphan nuclear receptors as drug targets for the treatment of prostate and breast cancers. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(10):1137-52. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.10.005>
92. Castrillo A, Tontonoz P. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:455-80. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.012103.134432>
93. Szanto A, Roszer T. Nuclear receptors in macrophages: a link between metabolism and inflammation. *FEBS Lett*. 2008;582(1):106-16. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.020>

94. Valledor AF, Ricote M. Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(2):201-12. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.10.016>
95. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988;240(4854):889-95. <https://doi.org/10.1126/science.3283939>
96. Adcock IM, Barnes PJ. Ligand-induced differentiation of glucocorticoid receptor (GR) trans-repression and transactivation. *Biochem Soc Trans.* 1996;24(2):267s. <https://doi.org/10.1042/bst024267s>
97. Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol.* 1996;60(5):563-72. <https://doi.org/10.1002/jlb.60.5.563>
98. Joyce DA, Steer JH, Abraham LJ. Glucocorticoid modulation of human monocyte/macrophage function: control of TNF-alpha secretion. *Inflamm Res.* 1997;46(11):447-51. <https://doi.org/10.1007/s000110050222>
99. Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Förstermann U. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol.* 1996;49(1):15-21. <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/content/abstract/49/1/15>
100. McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev.* 1999;20(4):435-59. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.4.0375>
101. Tanaka J, Fujita H, Matsuda S, Toku K, Sakanaka M, Maeda N. Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia.* 1997;20(1):23-37. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199705\)20:1%3C23::AID-GLIA3%3E3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199705)20:1%3C23::AID-GLIA3%3E3.0.CO;2-6)
102. Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala RK, Westin S, et al. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell.* 2005;122(5):707-21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.029>
103. Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(9):4312-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4312>
104. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995;83(5):803-12. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90193-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90193-0)
105. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell.* 1995;83(5):813-9. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90194-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90194-9)
106. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome

proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(9):4318-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4318>

107. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998;93(2):229-40. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81574-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81574-3)

108. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998;93(2):241-52. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81575-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81575-5)

109. Szanto A, Benko S, Szatmari I, Balint BL, Furtos I, Rühl R, et al. Transcriptional regulation of human CYP27 integrates retinoid, peroxisome proliferator-activated receptor, and liver X receptor signaling in macrophages. *Mol Cell Biol*. 2004;24(18):8154-66. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.18.8154-8166.2004>

110. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, et al. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*. 1998;273(40):25573-80. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25573>

111. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998;391(6662):82-6. <https://doi.org/10.1038/34184>

112. Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science*. 2003;302(5644):453-7. <https://doi.org/10.1126/science.1087344>

113. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998;391(6662):79-82. <https://doi.org/10.1038/34178>

114. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem*. 1999;274(45):32048-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32048>

115. Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol*. 2004;5(1):104-12. <https://doi.org/10.1038/ni1018>

116. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*. 2005;437(7059):759-63. <https://doi.org/10.1038/nature03988>

117. Syrovets T, Schüle A, Jendrach M, Büchele B, Simmet T. Ciglitazone inhibits plasmin-induced proinflammatory monocyte activation via modulation of p38 MAP kinase activity. *Thromb Haemost*. 2002;88(2):274-81. <https://sci-hub.se/10.1055/s-0037-1613198>

118. Ghisletti S, Huang W, Ogawa S, Pascual G, Lin ME, Willson TM, et al. Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell*. 2007;25(1):57-70. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.022>
119. Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol*. 2007;28(12):551-8. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.09.003>
120. Hevener AL, Olefsky JM, Reichart D, Nguyen MT, Bandyopadhyay G, Leung HY, et al. Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. *J Clin Invest*. 2007;117(6):1658-69. <https://doi.org/10.1172/jci31561>
121. Kang K, Reilly SM, Karabacak V, Gangl MR, Fitzgerald K, Hatano B, Lee CH. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab*. 2008;7(6):485-95. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.04.002>
122. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*. 2007;447(7148):1116-20. <https://doi.org/10.1038/nature05894>
123. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*. 2008;7(6):496-507. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.04.003>
124. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(1):266-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.266>
125. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*. 1996;383(6602):728-31. <https://doi.org/10.1038/383728a0>
126. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem*. 1997;272(6):3137-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.6.3137>
127. Peet DJ, Janowski BA, Mangelsdorf DJ. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev*. 1998;8(5):571-5. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(98\)80013-0](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(98)80013-0)
128. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(2):507-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.507>
129. Tangirala RK, Bischoff ED, Joseph SB, Wagner BL, Walczak R, Laffitte BA, et al. Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18):11896-901. <https://doi.org/10.1073/pnas.182199799>

130. Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem.* 2003;278(12):10443-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.m213071200>
131. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med.* 2003;9(2):213-9. <https://doi.org/10.1038/nm820>
132. Joseph SB, Bradley MN, Castrillo A, Bruhn KW, Mak PA, Pei L, et al. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell.* 2004;119(2):299-309. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.032>
133. Valledor AF, Hsu LC, Ogawa S, Sawka-Verhelle D, Karin M, Glass CK. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(51):17813-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407749101>
134. N AG, Guillen JA, Gallardo G, Diaz M, de la Rosa JV, Hernandez IH, et al. The nuclear receptor LXR $\alpha$  controls the functional specialization of splenic macrophages. *Nat Immunol.* 2013;14(8):831-9. <https://doi.org/10.1038/ni.2622>
135. Levi M, Wang X, Choudhury D. Nuclear hormone receptors as therapeutic targets. *Contrib Nephrol.* 2011;170:209-16. <https://doi.org/10.1159/000325668>
136. Zhan YY, Chen Y, Zhang Q, Zhuang JJ, Tian M, Chen HZ, et al. The orphan nuclear receptor Nur77 regulates LKB1 localization and activates AMPK. *Nat Chem Biol.* 2012;8(11):897-904. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1069>
137. Hu YW, Zhang P, Yang JY, Huang JL, Ma X, Li SF, et al. Nur77 decreases atherosclerosis progression in apoE(-/-) mice fed a high-fat/high-cholesterol diet. *PLoS One.* 2014;9(1):e87313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087313>
138. Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW. Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol Endocrinol.* 1992;6(12):2129-35. <https://doi.org/10.1210/mend.6.12.1491694>
139. Milbrandt J. Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron.* 1988;1(3):183-8. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90138-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90138-9)
140. Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K. Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1308(3):205-14. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(96\)00101-7](https://doi.org/10.1016/0167-4781(96)00101-7)
141. Martínez-González J, Badimon L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res.* 2005;65(3):609-18. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.10.002>
142. Barish GD, Downes M, Alaynick WA, Yu RT, Ocampo CB, Bookout AL, et al. A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Mol Endocrinol.* 2005;19(10):2466-77. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0529>

143. Sekiya T, Hibino S, Saeki K, Kanamori M, Takaki S, Yoshimura A. Nr4a Receptors Regulate Development and Death of Labile Treg Precursors to Prevent Generation of Pathogenic Self-Reactive Cells. *Cell Rep.* 2018;24(6):1627-38.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.008>
144. Sekiya T, Kashiwagi I, Inoue N, Morita R, Hori S, Waldmann H, et al. The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4+ T cells. *Nat Commun.* 2011;2:269. <https://doi.org/10.1038/ncomms1272>
145. Tel-Karthauss N, Kers-Rebel ED, Looman MW, Ichinose H, de Vries CJ, Ansems M. Nuclear Receptor Nur77 Deficiency Alters Dendritic Cell Function. *Front Immunol.* 2018;9:1797. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01797>
146. Zhao Y, Bruemmer D. NR4A Orphan Nuclear Receptors in Cardiovascular Biology. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2009;6(1-4):e43-e8. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2009.06.001>
147. De Miranda BR, Popichak KA, Hammond SL, Jorgensen BA, Phillips AT, Safe S, Tjalkens RB. The Nurr1 Activator 1,1-Bis(3'-Indolyl)-1-(p-Chlorophenyl)Methane Blocks Inflammatory Gene Expression in BV-2 Microglial Cells by Inhibiting Nuclear Factor κB. *Mol Pharmacol.* 2015;87(6):1021-34. <https://doi.org/10.1124/mol.114.095398>
148. Kinoshita K, Matsumoto K, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H. A Nurr1 agonist amodiaquine attenuates inflammatory events and neurological deficits in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *J Neuroimmunol.* 2019;330:48-54. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.02.010>
149. Montarolo F, Raffaele C, Perga S, Martire S, Finardi A, Furlan R, et al. Effects of isoxazolo-pyridinone 7e, a potent activator of the Nurr1 signaling pathway, on experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *PLoS One.* 2014;9(9):e108791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108791>
150. Park TY, Jang Y, Kim W, Shin J, Toh HT, Kim CH, et al. Chloroquine modulates inflammatory autoimmune responses through Nurr1 in autoimmune diseases. *Sci Rep.* 2019;9(1):15559. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52085-w>
151. Safe S, Jin UH, Morpurgo B, Abudayyeh A, Singh M, Tjalkens RB. Nuclear receptor 4A (NR4A) family - orphans no more. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;157:48-60. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.04.016>
152. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J. Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol.* 1997;17(10):5946-51. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.10.5946>
153. Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science.* 1991;252(5010):1296-300. <https://doi.org/10.1126/science.1925541>
154. Perlmann T, Jansson L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.* 1995;9(7):769-82. <https://doi.org/10.1101/gad.9.7.769>

155. Palumbo-Zerr K, Zerr P, Distler A, Fliehr J, Mancuso R, Huang J, et al. Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor- $\beta$  signaling and fibrosis. *Nat Med.* 2015;21(2):150-8. <https://doi.org/10.1038/nm.3777>
156. Wansa KD, Harris JM, Muscat GE. The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment. *J Biol Chem.* 2002;277(36):33001-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.m203572200>
157. Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, et al. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell.* 2009;137(1):47-59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.038>
158. Maxwell MA, Muscat GE. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal.* 2006;4:e002. <https://doi.org/10.1621/nrs.04002>
159. Mohan HM, Aherne CM, Rogers AC, Baird AW, Winter DC, Murphy EP. Molecular pathways: the role of NR4A orphan nuclear receptors in cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(12):3223-8. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-11-2953>
160. Pei L, Castrillo A, Chen M, Hoffmann A, Tontonoz P. Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli. *J Biol Chem.* 2005;280(32):29256-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.m502606200>
161. Niu G, Lu L, Gan J, Zhang D, Liu J, Huang G. Dual roles of orphan nuclear receptor TR3/Nur77/NGFI-B in mediating cell survival and apoptosis. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2014;313:219-58. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800177-6.00007-4>
162. Bonta PI, van Tiel CM, Vos M, Pols TW, van Thienen JV, Ferreira V, et al. Nuclear receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid loading and inflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(10):2288-94. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000238346.84458.5d>
163. Hanna RN, Shaked I, Hubbeling HG, Punt JA, Wu R, Herrley E, et al. NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ Res.* 2012;110(3):416-27. <https://doi.org/10.1161/circresaha.111.253377>
164. Li L, Liu Y, Chen HZ, Li FW, Wu JF, Zhang HK, et al. Impeding the interaction between Nur77 and p38 reduces LPS-induced inflammation. *Nat Chem Biol.* 2015;11(5):339-46. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1788>
165. Mahajan S, Saini A, Chandra V, Nanduri R, Kalra R, Bhagyaraj E, et al. Nuclear Receptor Nr4a2 Promotes Alternative Polarization of Macrophages and Confers Protection in Sepsis. *J Biol Chem.* 2015;290(30):18304-14. <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.638064>
166. De Paoli F, Eeckhoutte J, Copin C, Vanhoutte J, Duhem C, Derudas B, et al. The neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1) is induced upon human alternative macrophage polarization and stimulates the expression of markers of the M2 phenotype. *Atherosclerosis.* 2015;241(1):18-26. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.798>

167. Johnson MM, Michelhaugh SK, Bouhamdan M, Schmidt CJ, Bannon MJ. The Transcription Factor NURR1 Exerts Concentration-Dependent Effects on Target Genes Mediating Distinct Biological Processes. *Front Neurosci.* 2011;5:135. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00135>
168. De Miranda BR, Popichak KA, Hammond SL, Miller JA, Safe S, Tjalkens RB. Novel para-phenyl substituted diindolylmethanes protect against MPTP neurotoxicity and suppress glial activation in a mouse model of Parkinson's disease. *Toxicol Sci.* 2015;143(2):360-73. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu236>
169. Hammond SL, Popichak KA, Li X, Hunt LG, Richman EH, Damale PU, et al. The Nurr1 Ligand, 1,1-bis(3'-Indolyl)-1-(p-Chlorophenyl)Methane, Modulates Glial Reactivity and Is Neuroprotective in MPTP-Induced Parkinsonism. *J Pharmacol Exp Ther.* 2018;365(3):636-51. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.246389>
170. Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Blanco FJ, Nieto C, Bragado R, Palomero MI, et al. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood.* 2011;117(19):5092-101. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-306993>
171. González-Domínguez É, Domínguez-Soto Á, Nieto C, Flores-Sevilla JL, Pacheco-Blanco M, Campos-Peña V, et al. Atypical Activin A and IL-10 Production Impairs Human CD16+ Monocyte Differentiation into Anti-Inflammatory Macrophages. *J Immunol.* 2016;196(3):1327-37. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501177>
172. Han QW, Shao QH, Wang XT, Ma KL, Chen NH, Yuan YH. CB2 receptor activation inhibits the phagocytic function of microglia through activating ERK/AKT-Nurr1 signal pathways. *Acta Pharmacol Sin.* 2022;43(9):2253-66. <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00853-8>
173. Munoz-Tello P, Lin H, Khan P, de Vera IMS, Kamenecka TM, Kojetin DJ. Assessment of NR4A Ligands That Directly Bind and Modulate the Orphan Nuclear Receptor Nurr1. *J Med Chem.* 2020;63(24):15639-54. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00894>
174. Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology.* 2006;211(6-8):609-18. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.05.025>
175. Garcia-Bonilla L, Faraco G, Moore J, Murphy M, Racchumi G, Srinivasan J, et al. Spatio-temporal profile, phenotypic diversity, and fate of recruited monocytes into the post-ischemic brain. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):285. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0750-0>
176. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(1):23-63. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30>
177. Wu S, Sun H, Zhang Q, Jiang Y, Fang T, Cui I, et al. MicroRNA-132 promotes estradiol synthesis in ovarian granulosa cells via translational repression of Nurr1. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13:94. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0095-z>

178. Xie X, Peng L, Zhu J, Zhou Y, Li L, Chen Y, et al. miR-145-5p/Nurr1/TNF- $\alpha$  Signaling-Induced Microglia Activation Regulates Neuron Injury of Acute Cerebral Ischemic/Reperfusion in Rats. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:383. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00383>
179. Yang D, Li T, Wang Y, Tang Y, Cui H, Tang Y, et al. miR-132 regulates the differentiation of dopamine neurons by directly targeting Nurr1 expression. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 7):1673-82. <https://doi.org/10.1242/jcs.086421>
180. Holla VR, Mann JR, Shi Q, DuBois RN. Prostaglandin E2 regulates the nuclear receptor NR4A2 in colorectal cancer. *J Biol Chem*. 2006;281(5):2676-82. <https://doi.org/10.1074/jbc.m507752200>
181. Murphy EP, McEvoy A, Conneely OM, Bresnihan B, FitzGerald O. Involvement of the nuclear orphan receptor NURR1 in the regulation of corticotropin-releasing hormone expression and actions in human inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 2001;44(4):782-93. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200104\)44:4%3C782::aid-anr134%3E3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200104)44:4%3C782::aid-anr134%3E3.0.co;2-h)
182. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*. 2007;19(1):24-32. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.004>
183. Murphy EP, Crean D. Molecular Interactions between NR4A Orphan Nuclear Receptors and NF- $\kappa$ B Are Required for Appropriate Inflammatory Responses and Immune Cell Homeostasis. *Biomolecules*. 2015;5(3):1302-18. <https://doi.org/10.3390/biom5031302>
184. McEvoy AN, Murphy EA, Ponnio T, Conneely OM, Bresnihan B, FitzGerald O, Murphy EP. 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. *J Immunol*. 2002;168(6):2979-87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.6.2979>
185. Yao PL, Parmar VM, Choudhary M, Malek G. NURR1 expression regulates retinal pigment epithelial-mesenchymal transition and age-related macular degeneration phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(28):e2202256119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2202256119>
186. Li X, Lee SO, Safe S. Structure-dependent activation of NR4A2 (Nurr1) by 1,1-bis(3'-indolyl)-1-(aromatic)methane analogs in pancreatic cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(10):1445-55. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.02.021>
187. Do JH. Identifying transcription factor NURR1 expression-level specific pathways with gene signaling networks. *BioChip Journal*. 2014;8:102-14. <http://dx.doi.org/10.1007%2Fs13206-014-8205-0>
188. Aherne CM, McMorrow J, Kane D, FitzGerald O, Mix KS, Murphy EP. Identification of NR4A2 as a transcriptional activator of IL-8 expression in human inflammatory arthritis. *Mol Immunol*. 2009;46(16):3345-57. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.07.019>
189. Merino-Zamorano C, Hernández-Guillamon M, Jullienne A, Le Béhot A, Bardou I, Parés M, et al. NURR1 involvement in recombinant tissue-type plasminogen activator treatment complications after ischemic stroke. *Stroke*. 2015;46(2):477-84. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.114.006826>

190. Afzali MF, Popichak KA, Burton LH, Klochak AL, Wilson WJ, Safe S, et al. A novel diindolylmethane analog, 1,1-bis(3'-indolyl)-1-(p-chlorophenyl) methane, inhibits the tumor necrosis factor-induced inflammatory response in primary murine synovial fibroblasts through a Nurr1-dependent mechanism. *Mol Immunol.* 2018;101:46-54. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.024>
191. McEvoy C, de Gaetano M, Giffney HE, Bahar B, Cummins EP, Brennan EP, et al. NR4A Receptors Differentially Regulate NF- $\kappa$ B Signaling in Myeloid Cells. *Front Immunol.* 2017;8:7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00007>
192. Campos-Melo D, Galleguillos D, Sánchez N, Gysling K, Andrés ME. Nur transcription factors in stress and addiction. *Front Mol Neurosci.* 2013;6:44. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00044>
193. Li W, Liu X, Tu Y, Ding D, Yi Q, Sun X, et al. Dysfunctional Nurr1 promotes high glucose-induced Müller cell activation by up-regulating the NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome axis. *Neuropeptides.* 2020;82:102057. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2020.102057>
194. Shao QH, Yan WF, Zhang Z, Ma KL, Peng SY, Cao YL, et al. Nurr1: A vital participant in the TLR4-NF- $\kappa$ B signal pathway stimulated by  $\alpha$ -synuclein in BV-2 cells. *Neuropharmacology.* 2019;144:388-99. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.04.008>
195. Doi Y, Oki S, Ozawa T, Hohjoh H, Miyake S, Yamamura T. Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(24):8381-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803454105>