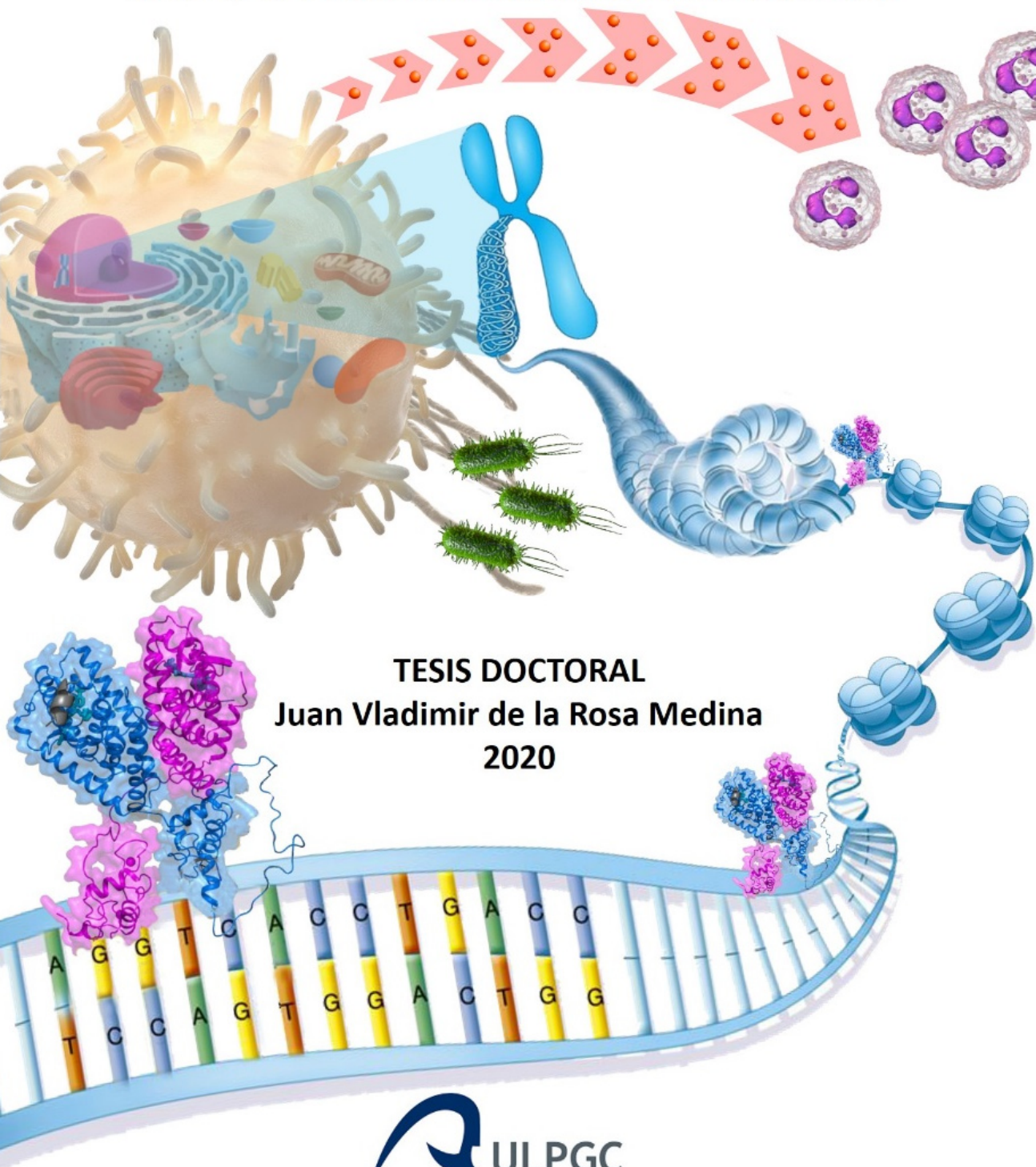


EL PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR LXR α EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA DEL MACRÓFAGO



TESIS DOCTORAL
Juan Vladimir de la Rosa Medina
2020



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
PROGRAMA DE DOCTORADO: BIOMEDICINA

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO:

BIOMEDICINA



Memoria para la Obtener el Grado de **DOCTOR**:

“EL PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR LXR α EN LA RESPUESTA
INFLAMATORIA DEL MACRÓFAGO”

Presentada por:

Juan Vladimir de la Rosa Medina

Licenciado en Biología

El Doctorando:

El Director:

El Codirector:

Juan Vladimir de
la Rosa Medina

Antonio Castrillo
Viguera

Carlos Tabraue
Tarbay

Las Palmas de Gran Canaria, a 29 de enero de 2020

D. Antonio Castrillo Viguera, Investigador del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y perteneciente a la Unidad Asociada ULPGC-CSIC, D. Carlos Tabraue Tarbay, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Morfología.

CERTIFICAN,

Que D. Juan Vladimir de la Rosa Medina, licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección y asesoramiento el trabajo de investigación titulado:

EL PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR LXR α EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA DEL MACRÓFAGO

Una vez revisada la presente memoria, la encuentran apta para su defensa ante el tribunal para la obtención del título de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Y para que así conste y surta a los efectos oportunos, extiende la presente certificación en Las Palmas de Gran Canaria, a 29 de enero de 2020.

El Director:

El Codirector:

Antonio Castrillo
Viguera

Carlos Tabraue
Tarbay



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS Y SANITARIAS
(IUIBS)

PROGRAMA DE DOCTORADO: BIOMEDICINA

Grupo de Investigación en Inflamación y señalización (GIMAS)

TESIS DOCTORAL

***“EL PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR LXR α EN LA
RESPUESTA INFLAMATORIA DEL MACRÓFAGO”***

Juan Vladimir de la Rosa Medina

Las Palmas de Gran Canaria, 2020

Dedicada a:

Los familiares que ya no están,
A mis padres y hermana.

La ciencia consiste en el arte
de conjuntar todas las piezas
de conocimiento desordenadas,
que forman parte del gran puzle
que constituye todo el Universo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director de Tesis, el Dr. Antonio Castrillo toda la confianza depositada en mí para poder desarrollar este trabajo, así como la transmisión de sus conocimientos, que me han permitido poder desarrollarme en mis segundos inicios como investigador. Gracias por todo tu apoyo y por la amistad que me has brindado.

En segundo lugar y no por eso menos importante quiero agradecer enormemente a Carlos, Germán y Félix toda la ayuda inmensurable que me han aportado durante las diferentes etapas de mi vida en la Universidad, así como la amistad que se ha ido tejiendo a lo largo de todos estos años. Me gustaría también incluir dentro de este grupo, aunque actualmente se encuentre un poco alejado de él a Manolo, quién fuera mi primer mentor durante mis inicios en el mundo de la investigación y el que despertó mi, el interés actual por el conocimiento y la investigación.

A los que fueron mis verdaderos compañeros de tropelías en el laboratorio (Mercí, JÓse, Irene, Susana, Ana, Noelia (técnico), Ester y Sheila), y a las que conocí fuera de él, Noe, Cristina y Lidia, muchas gracias por la ayuda y los gratos momentos que disfrutamos tanto dentro del labo como fuera de él.

Al resto de compañeros de la facultad (Sonia, Ignacio, Vandí, Paco, Pepe, Borja, Antonio, Mercedes Mirecki, Mercedes Said, Elisa, Patri, Yeray, Carlos, Elena, Ester, Enoc, Haidee, Rober, Silvia, Joaquín, Tina, Ana (técnico), Carmen, Dácil, Julia, Laura, Paloma, Cristina (técnico) y Nico), con los que compartí en algún momento de mi vida cosas como un café en el desayuno, un asadero, almuerzo o cena de navidad, y como no, algún que otro reactivo de laboratorio.

En la lejanía que nos separa del continente, a Marta por la ayuda inestimable con los experimentos realizados para el ensayo in vivo. A

Mariano Sánchez, Ángel Corbí, Inés Pineda y Anabel Valledor por haberme brindado la oportunidad de colaborar en diferentes proyectos, aportando mi pequeño granito de arena.

Por último, a toda mi familia, principalmente a mis padres y el resto de amigos, los cuales siempre han estado ahí para apoyarme tanto en los malos como en los buenos momentos.

RESUMEN

Los receptores nucleares LXR (Liver X Receptors), constituidos por las isoformas LXR α y LXR β desarrollan de manera conjunta, funciones relacionadas con la regulación del metabolismo del colesterol, de los ácidos grasos y de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, a pesar de que han transcurrido más de dos décadas desde su descubrimiento, se conocen muy pocas funciones específicas, no compartidas, por cada una de las isoformas de LXR. Por otra parte, los mecanismos moleculares que se han propuesto hasta ahora para explicar las funciones que desempeñan estos receptores en la regulación de la respuesta inflamatoria en el macrófago, son dispares y no esclarecen por completo esta cuestión. Por ello, es necesario ahondar en el estudio de la regulación transcripcional mediada por LXR en el contexto de la activación de la respuesta inmune innata en macrófagos.

Esta Tesis Doctoral, aborda esa cuestión desde dos ángulos distintos. Primero, empleando un sistema de expresión ectópica individual, de LXR α o LXR β en macrófagos inmortalizados y aplicando una estrategia de activación farmacológica, hemos analizado los cambios globales de expresión génica y de ocupación genómica de LXR α y LXR β , así como los cambios epigenómicos en los estados de máxima activación y máxima represión. Este estudio nos ha ayudado a establecer un nuevo modelo de regulación por los receptores LXR, así como nuevas dianas génicas y funciones biológicas diferenciales entre las dos isoformas de LXR.

Como resultado de este estudio, decidimos investigar un segundo aspecto relacionado con las vías de señalización que regulan la expresión de LXR α , de manera específica durante la respuesta inmune innata inducida en macrófagos in vitro e in vivo, en respuesta a componentes de la pared bacteriana. Por otra parte, también estudiamos el programa de expresión génica regulado específicamente por esta isoforma. Los resultados revelaron que LXR α participa en la regulación de varios genes,

Resumen

relacionados con funciones implicadas en el reclutamiento de células mieloides en respuesta a estímulos inflamatorios, en un modelo de peritonitis in vivo.

En conclusión, esta Tesis Doctoral aporta evidencias experimentales, que sugieren que los receptores LXR desempeñan funciones transcripcionales diferenciadas, no solapantes, en el macrófago murino. Además, LXR α desempeña un papel muy importante en la respuesta inmune innata frente a estímulos inflamatorios, que puede constituir un punto de partida interesante, que permita explotar estas nuevas funciones desempeñadas por LXR para combatir las infecciones bacterianas y víricas.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. El sistema inmune.....	7
1.1. La inmunidad innata.....	9
1.2. La inmunidad adaptativa.....	10
1.3. Las células de la inmunidad innata.	11
1.3.1. Las células de origen hematopoyético.	11
1.3.1.1. Los monocitos.....	11
1.3.1.2. Los macrófagos.....	12
1.3.1.3. Los neutrófilos.	16
1.4. La respuesta inflamatoria.....	17
1.4.1. Mecanismos de la respuesta inflamatoria.....	19
1.4.2. Receptores de Reconocimiento de Patrón (PRRs).....	19
1.4.2.1. Receptores “Tipo Toll” (TLRs).	20
1.4.3. Regulación de la respuesta inflamatoria.	25
2. Superfamilia de receptores nucleares.....	32
2.1. Estructura de los Receptores Nucleares.	33
2.1.1. Interacción de los Receptores con sus ligandos.	35
2.1.2. Interacción de los Receptores con el DNA.....	36
2.1.3. Interacción de los Receptores con proteínas correguladoras.	38
2.1.4. Regulación transcripcional mediada por Receptores Nucleares.	40
2.2. Los Receptores X Hepáticos (LXRs).	41
2.2.1. Tipos de receptores LXRs.....	41
2.2.2. Mecanismos de acción de los Receptores LXR.	42
2.2.3. Función de los receptores LXRs en el metabolismo.	43
2.2.4. Función de los Receptores LXR en la inflamación.....	47
2.2.5. Función antimicrobiana de los Receptores LXR.....	51

Índice

MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
1. Animales de experimentación.	61
1.1. Ratones Knockout.	61
2. Cultivos celulares.	62
2.1. Cultivos primarios de macrófagos derivados de médula ósea.....	63
2.2. Cultivos de macrófagos peritoneales.....	64
2.3. Líneas celulares inmortales (iBMDMs).....	65
3. Tratamientos farmacológicos in vitro.	65
4. Tratamientos farmacológicos in vivo.	67
5. Anticuerpos.....	67
6. Análisis de proteínas por Western Blot.....	67
7. Análisis de expresión de mRNA.	70
7.1. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).	71
7.2. Expresión de mRNA por Microarray.....	73
8. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).	74
8.1. Fijación, purificación y sonicado de la cromatina.	76
8.2. Inmunoprecipitación de la cromatina.....	78
8.3. ChIP-qPCR.....	79
8.4. ChIP-seq.	81
8.5. Análisis Bioinformático de los datos de ChIP-seq.	81
9. Citometría de flujo.	84
10. Análisis estadístico.	85
RESULTADOS.....	87
1. Estudio de los receptores LXRs en un modelo de iBMDMs.....	89
1.1. Caracterización de las líneas celulares iBMDMs.	91
2. Distribución genómica de los receptores LXRα y LXRβ.	91
3. Expresión genómica en las líneas de iBMDM.	101
4. Correlación entre los datos de expresión y de ChIP-seq.....	107

5. Expresión del receptor LXRα en la inflamación.	109
5.1. Expresión de los receptores LXRs por mediadores inflamatorios.	110
5.2. Expresión diferencial entre LXR α y LXR β en respuesta al LPS en BMDMs.....	112
5.3. Expresión de genes diana de LXRs en respuesta al LPS.....	117
6. Caracterización de las vías de señalización intracelular que regulan la expresión de LXRα.	118
6.1. Análisis de la vía de señalización dependiente de NF-κB.	118
6.2. Análisis de la región promotora de <i>Nr1h3</i> (LXR α).	122
6.3. Análisis de la vía de señalización dependiente de IRF3.	124
7. Expresión génica dependiente de LXRα en respuesta al LPS.....	127
7.1. Regulación de las dianas génicas dependientes de LXR α en respuesta al LPS.	132
8. Análisis de la ocupación genómica de LXRα en respuesta al LPS.	134
9. Estudio de LXRα en un modelo in vivo de peritonitis.	139
9.1. Análisis de las poblaciones celulares in vivo en respuesta al LPS.	139
<i>DISCUSIÓN</i>	147
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>.....	171
<i>ANEXO I. BOLTS ORIGINALES</i>	199
<i>ANEXO II. FINANCIACIÓN</i>.....	209
<i>ANEXO III. Curriculum Vitae</i>.....	213

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN	5
Fig. 1. Componentes del sistema inmune.....	8
Fig. 2. Subpoblaciones de macrófagos residentes tisulares.	13
Fig. 3. Origen embrionario de los macrófagos.....	15
Fig. 4. Mecanismos de defensa del neutrófilo.....	18
Fig. 5. Vías de señalización de los receptores TLRs.....	23
Fig. 6. Selección y activación de enhancers específicos de tipo celular.	28
Fig. 7. Estructura de los miembros de la superfamilia de Receptores Nucleares.	34
Fig. 8. Interacción de miembros de la Superfamilia de Receptores Nucleares con el ligando.....	37
Fig. 9. Interacción de los Receptores Nucleares con el DNA.	39
Fig. 10. Mecanismos de acción de los receptores LXR.....	44
Fig. 11. Función de los receptores LXR en el macrófago.	46
MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
Fig. 1. Condiciones de los ciclos de amplificación por qPCR.....	72
Fig. 2. Esquema de las distintas etapas de la técnica de ChIP-seq.	75
Fig. 3. Flujo de trabajo para el análisis de datos de ChIP-seq.....	83
RESULTADOS	87
Fig. 1. Esquema de la generación de las iBMDM-LXR α y iBMDM-LXR β	90
Fig. 2. Caracterización por WB de las iBMDMs.....	92
Fig. 3. Caracterización por ChIP-pcr de las iBMDMs.....	93
Fig. 4. Análisis del ChIP-seq en iBMDM-LXR α y iBMDM-LXR β y RXR en BMDMs.	95
Fig. 5. Análisis de patrones de secuencias de unión para TFs.	97
Fig. 6. Análisis de las funciones biológicas de genes próximos a las regiones ocupadas por LXR.....	99

Fig. 7. Análisis del ChIP-seq de H3K27Ac en células iBMDM-LXR α y iBMDM-LXR β100

Fig. 8. Análisis de la expresión diferencial por microarray en iBMDM de genes regulados por iBMDM-LXR α y iBMDM-LXR β103

Fig. 9. Análisis de la expresión diferencial por microarray en iBMDM de genes regulados por iBMDM-LXR α104

Fig. 10. Análisis de la expresión diferencial por microarray de genes regulados por iBMDM-LXR β105

Fig. 11. Correlación entre los datos de microarray y ChIP-seq en iBMDM.....108

Fig. 12. Análisis de la expresión de genes inflamatorios por Microarray.111

Fig. 13. Expresión de LXR α en distintos cultivos de macrófagos.113

Fig. 14. Expresión diferencial de LXR α y LXR β en BMDM.114

Fig. 15. Estabilidad de la expresión de LXR α y LXR β en BMDM.....116

Fig. 16. Expresión de genes diana de LXR en respuesta a LPS.119

Fig. 17. Análisis de la vía de señalización dependiente de NF κ B.121

Fig. 18. Análisis de la región promotora de Nr1h3 (LXR α) por ChIP-seq.123

Fig. 19. Análisis de la vía de señalización activada por IRF3.125

Fig. 20. Análisis de la vía de señalización dependiente del INF β126

Fig. 21. Análisis de los componentes que regulan la señalización activada por el INF β128

Fig. 22. Expresión génica dependiente de LXR α en respuesta al LPS.130

Fig. 23. Funciones biológicas dependientes de la expresión de LXR α en respuesta al LPS.131

Fig. 24. Expresión de dianas de LXR α en respuesta al LPS e implicación de ligandos endógenos.133

Figura 25. Análisis del ChIP-seq de LXR α en respuesta a LPS.135

Figura 26. Análisis del ChIP-seq de LXR α , PU.1, H3K27Ac y H3K4me1 en respuesta al LPS en BMDMs.....137

Figura 27. Análisis de regiones reguladoras en respuesta al LPS en BMDMs y macrófagos peritoneales.....138

Figura 28. Análisis de la población de neutrófilos in vivo en modelo de peritonitis.....141

Índice

Fig. 29. Análisis de la población de macrófagos in vivo en modelo de peritonitis.	143
Fig. 30. Análisis de la población de neutrófilos y de macrófagos en respuesta al LPS.	144
DISCUSIÓN	147
Fig. 1. Representación de los mecanismos de acción de los receptores LXR. .	156
Fig. 2. Representación del modelo de acción de LXR durante la respuesta inflamatoria	165

ÍNDICE DE TABLAS

MATERIAL Y MÉTODOS.....59

Tabla 1. Listado de anticuerpos.....68

Tabla 2. Listado de cebadores para qPCR.....72

Tabla 3. Listado de primers para CHIP-qPCR.....80

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ABC	<i>ATP-Binding Cassette Transporter</i>
AF	<i>Activation Function</i>
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
BMDM	<i>Bone Marrow Derived Macrophage</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
C/EBP	<i>CCAAT Enhancer-Binding Protein</i>
CCL	<i>C-C Motif Chemokine Ligand</i>
CD	<i>Cluster of Diferentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CHX	<i>Cicloheximide</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSG	<i>Di-N-succinimidil Glutarate</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
FADS	<i>Fatty acid desaturase</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
HAT	<i>Histone Acetyltransferase</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IDOL	<i>Increased Degradation of LDL Receptor</i>
IFNAR	<i>Interferon Alpha Receptor</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>
LBP	<i>LPS Binding Protein</i>
LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i>
LDTF	<i>Lineage Determinant Transcription Factor</i>
LPCAT	<i>Lysophosphatidylcholine Acyltransferase</i>
LPS	<i>Lipopolysacharide</i>
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
LXRE	<i>LXR Response Element</i>

Abreviaturas

MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response 88</i>
NCOR	<i>Nuclear Receptor Co-Repressor</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NOS2	<i>Nitric Oxide Synthase 2</i>
NR	<i>Nuclear Receptor</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PU.1	<i>PUrine-rich box 1</i>
RE	<i>Response Element</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SCD	<i>Stearoyl-CoA Desaturase</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Solution</i>
SREBP	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Protein</i>
SRTF	<i>Stimulus Regulated Transcription Factor</i>
STAT	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
TBK	<i>TRAF Associated NFκB activator Binding Kinase</i>
TF	<i>Transcription Factor</i>
TIR	<i>Toll / Interleukin-1 Receptor Homology Domain</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-Related Adaptor Molecule</i>
TRIF	<i>TIR Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN-β</i>
WT	<i>Wild Type</i>

INTRODUCCIÓN

1. El sistema inmune.

El sistema inmune está constituido por diferentes componentes que tienen como finalidad, la protección del cuerpo contra una gran variedad de organismos invasores. Esta función es llevada a término gracias a que cuenta con una compleja red de tejidos, células y moléculas que interactúan entre sí de manera orquestada, para combatir las agresiones invasoras ocasionadas por bacterias, virus, hongos y parásitos.

Los principales modos de acción involucrados en la defensa del cuerpo son la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata representa la primera línea de defensa contra los invasores. Este mecanismo de defensa, constituido por diferentes tipos celulares y moléculas, tiene la capacidad de reconocer componentes estructurales de las paredes microbianas, que se han mantenido muy conservados a lo largo del tiempo. Por otra parte, la inmunidad adaptativa es un mecanismo muy selectivo y específico, por lo que es mucho más lento en el tiempo, presentando un retraso entre la exposición al antígeno y la respuesta efectora máxima (**Figura 1**). El sistema inmune también es capaz de reaccionar frente a cualquier otro tipo de alteración, como ocurre en la proliferación descontrolada de las propias células del cuerpo (células tumorales), o frente al rechazo de trasplantes de tejidos u órganos (Warrington et al. 2011).

Además de las funciones de defensa, el sistema inmune puede desempeñar muchas otras funciones que son muy importantes para el organismo, como aquéllas relacionadas con el mantenimiento de las condiciones de homeostasis tisular (Casanova-Acebes et al. 2014; S. Wang et al. 2019).

Introducción

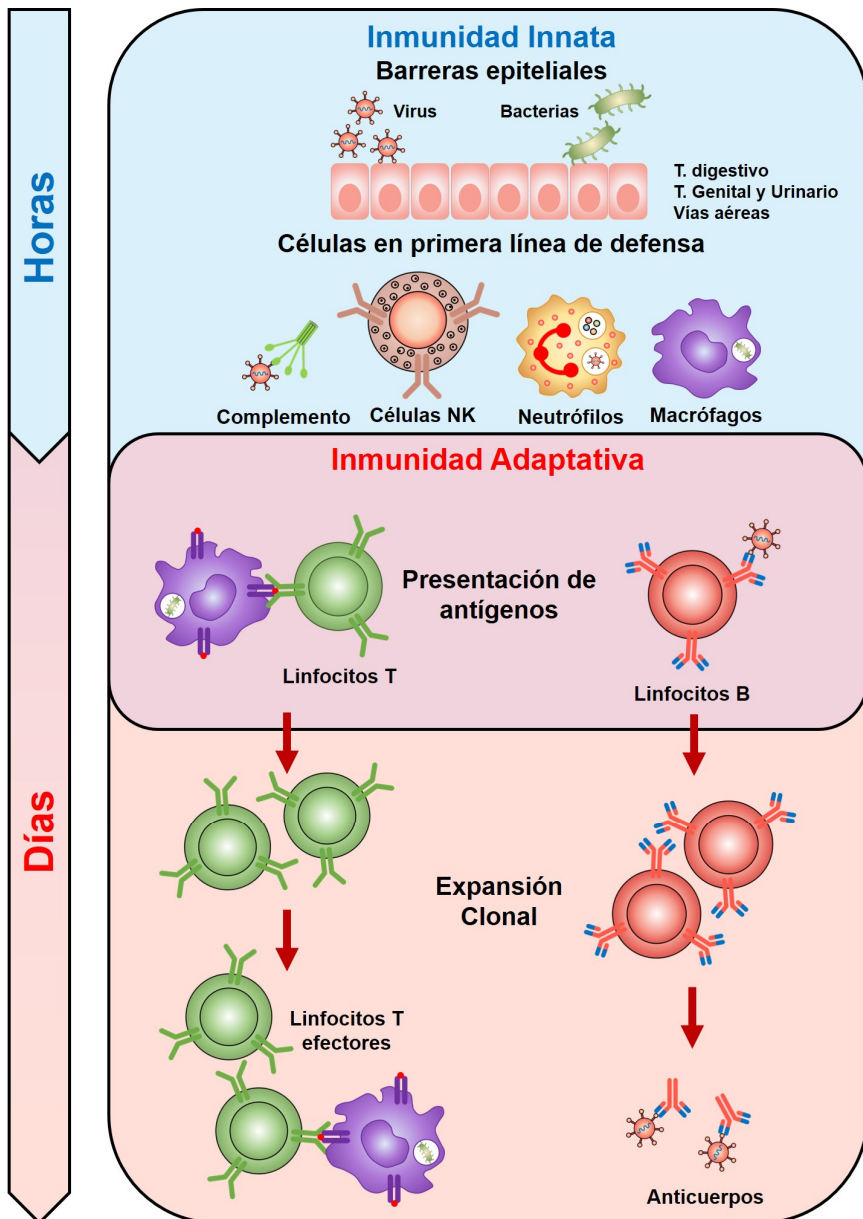


Figura 1. Componentes del sistema inmune.

El sistema de defensa contra los microorganismos patógenos está constituido por tres niveles de actuación: Barreras anatómicas y fisiológicas; Inmunidad Innata; e Inmunidad adaptativa.

1.1. La inmunidad innata.

La inmunidad innata es capaz de detectar la presencia de microorganismos, e iniciar los mecanismos necesarios para eliminar potenciales amenazas infecciosas. La detección microbiana se logra a través de los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), codificados en la línea germinal, que son capaces de analizar tanto el espacio extracelular como el intracelular en busca de determinantes microbianos conservados que sirven como indicadores de la infección (H. Kumar, Kawai, y Akira 2011). Los PRRs pueden ser activados por numerosos componentes estructurales bacterianos, fúngicos y virales, para inducir respuestas inmunitarias innatas que protegen al cuerpo de las amenazas infecciosas (Medzhitov 2009).

Los PRRs están constituidos por cinco familias de receptores, según las homologías entre sus dominios estructurales: Los receptores tipo Toll (TLRs), los Receptores de Lectina de tipo C (CLR), los receptores que contienen un dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD), los receptores tipo RIG-I (RLR) y los receptores tipo AIM2 (ALR) (H. Kumar, Kawai, y Akira 2011). Estas cinco familias de receptores, a su vez, se pueden agrupar en dos clases, en función de dónde se encuentre localizado el receptor. La primera clase incluye aquellos receptores que se encuentran unidos a la superficie de la membrana plasmática y a los receptores intracelulares que se encuentran en compartimentos endocíticos, como los TLR y las Lectinas tipo C. La segunda clase de receptores incluye otros que se encuentran localizados en el citoplasma, como los receptores tipo NOD, RIG o AIM2, cuya principal función es la de detectar a los patógenos intracelulares.

La activación de los PRRs conduce a la iniciación de vías de señalización específicas, que convergen en la expresión de moléculas como citoquinas proinflamatorias e interferones, que son críticos para

Introducción

iniciar tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, y activar funciones celulares efectoras como la fagocitosis, la autofagia y la muerte celular, con el objetivo final de contener la propagación de la infección (Deretic, Saitoh, y Akira 2013; Palm y Medzhitov 2009).

1.2. La inmunidad adaptativa.

Por el contrario, la inmunidad adaptativa es un mecanismo de defensa mucho más específico, con una respuesta más eficaz, que requiere de un mayor tiempo para su iniciación. Este mecanismo de defensa está dirigido principalmente por células de origen linfoide (Linfocitos T y B). Ambos tipos de linfocitos se producen constantemente a partir de células madre precursoras que residen en la médula ósea (Wherry y Masopust 2016).

La inmunidad adaptativa se encuentra bajo el control de la respuesta inmune innata, en un proceso que requiere tres tipos de señales: una señal inicial proporcionada por las células de la inmunidad innata mediante la presentación de péptidos antigénicos, necesarios para la activación y expansión de clones de células T, de una manera dependiente de antígeno. Las células presentadoras de antígeno (APC), producen una segunda señal a través de moléculas coestimuladoras secretadas por ellas mismas, únicamente cuando el antígeno presentado está relacionado con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Iwasaki y Medzhitov 2015). De esta manera, el sistema inmune es capaz de distinguir entre antígenos propios de los foráneos. La tercera señal consiste en la producción de citoquinas como resultado de la activación de PRRs (Jain y Pasare 2017). Las citoquinas liberadas al medio ayudan a que las células T se diferencien en subpoblaciones protectoras de células T, que son requeridas para la inmunidad del hospedador frente a un patógeno determinado.

1.3. Las células de la inmunidad innata.

La protección proporcionada por la inmunidad innata es una tarea en la que participan un amplio conjunto de células, esenciales para la defensa contra los organismos invasores. Algunos tipos celulares expresan varios tipos de PRRs capaces de reconocer multitud de PAMPs y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), que conducen a la producción de determinadas citoquinas inflamatorias necesarias para eliminar aquellos microorganismos invasores o células infectadas por estos. La capacidad de respuesta que tiene la inmunidad innata no solo es conferida por las células de origen hematopoyético, sino que también requiere de la participación de las células epiteliales que recubren la piel y los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario (Carrillo et al. 2017).

1.4. Las células de origen hematopoyético.

Las células de origen mieloide provienen de precursores hematopoyéticos localizados en la médula ósea en el individuo adulto, de los que derivan células que presentan funciones muy especializadas en la inmunidad innata como los monocitos, macrófagos, neutrófilos y otras células mieloides.

1.5. Los monocitos.

El monocito es un miembro del sistema fagocítico mononuclear, una familia de células mieloides que se origina a partir de precursores localizados en la médula ósea, lugar desde donde se incorporan al torrente sanguíneo, para posteriormente ser reclutados a los tejidos de todo el cuerpo, donde maduran y en última instancia se diferencian en macrófagos tisulares activados o residentes.

La población de monocitos circulantes en sangre es heterogénea, y se dividen en dos poblaciones, basándose en la presencia de marcadores

Introducción

de superficie específicos (LY6C en ratón, CD43 en rata y CD14/CD16 en humanos). La primera población la constituyen los monocitos clásicos, que expresan altos niveles de estos marcadores (LY6C^{hi} en ratón y CD14^{hi} en humanos). La segunda población, está constituida por monocitos no clásicos que expresan niveles muy bajos de los marcadores específicos (LY6C^{lo} en ratón y CD14^{lo} en humanos). Estas subpoblaciones también se van a distinguir por la expresión diferencial de receptores para quimioquinas (CCR2 y CX3CR1) (Hume, Irvine, y Pridans 2019). Los monocitos clásicos, además de una vida media muy corta, tienen la capacidad de migrar a través del endotelio y entrar en los tejidos en respuesta a determinadas señales, donde maduran hasta convertirse en macrófagos o en células dendríticas (DC), células fagocíticas especializadas en la digestión de microorganismos patógenos y en la eliminación de restos celulares. Por el contrario, los monocitos no clásicos, además de tener una vida media mucho más larga en circulación, desempeñan principalmente funciones de vigilia en los vasos sanguíneos, dando soporte a las células endoteliales (Jakubzick, Randolph, y Henson 2017).

1.6. Los macrófagos.

Los macrófagos constituyen una población muy heterogénea, mostrando diversos fenotipos funcionales, promovidos por las señales del microambiente que los rodea. De manera generalizada, los macrófagos se pueden dividir en dos tipos de poblaciones principales: una población de macrófagos especializados residentes en los tejidos, que se subdividen en diferentes subpoblaciones dependiendo de su localización y fenotipo funcional (**Figura 2**) (por ejemplo, la microglía en el sistema nervioso central, los osteoclastos en el hueso, o los macrófagos alveolares en el pulmón). Estos macrófagos se encuentran en prácticamente todos los tejidos, contribuyendo en el desarrollo, la vigilancia inmunológica y la

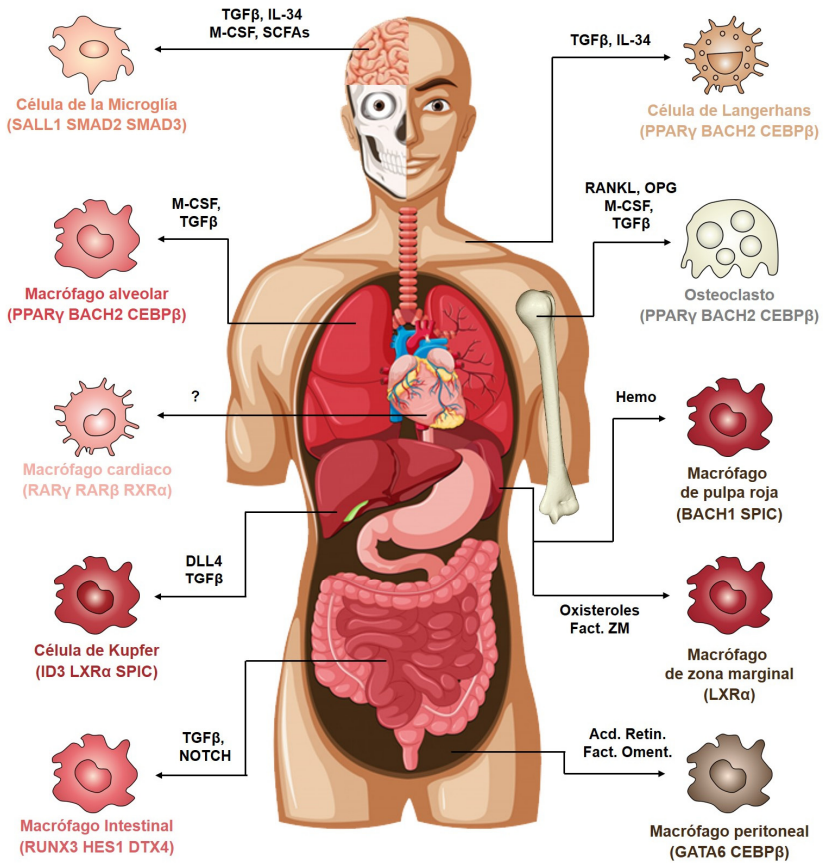


Figura 2. Subpoblaciones de macrófagos residentes tisulares.

Representación de las diferentes poblaciones de macrófagos tisulares, LDTFs, SRTFs y señales de nicho implicados en el desarrollo de los macrófagos.

(Modificado de Wouter T.J. et al. Cellular Immunology 2018).

Introducción

homeostasis y reparación de los tejidos que colonizan (Murray y Wynn 2011).

En ratones, las primeras células hematopoyéticas aparecen en los islotes sanguíneos del saco vitelino extraembrionario (YS) alrededor de la etapa E7.5, y producen eritrocitos y macrófagos primitivos, pero no linfocitos (Bertrand et al. 2005; Palis et al. 1999). En humanos, la hematopoyesis también se inicia en el YS extraembrionario durante la tercera semana de desarrollo y se limita a las células eritromieloides (Tavian y Peault 2003). Los progenitores derivados de YS migran hasta el hígado fetal a través del torrente sanguíneo después de la etapa E8.5, donde se van a propagar. Una vez que se establece la circulación sanguínea, se inicia rápidamente la primera ola de hematopoyesis intraembrionaria (McGrath et al. 2003; Palis y Yoder 2001). Una segunda ola de hematopoyesis en la etapa E10.5, surge en el embrión de ratón a partir de los principales vasos arteriales, dando lugar a las células madre hematopoyéticas (HSC) pluripotenciales definitivas (Kumaravelu et al. 2002). Posteriormente, las HSC proliferan en el hígado fetal hasta alcanzar su punto máximo en la etapa E16.5 antes de que se produzca la transición a la médula ósea, lugar que se convertirá en el sitio principal de la hematopoyesis en la vida adulta (Cumano y Godin 2007; Orkin y Zon 2008) (**Figura 3**).

La otra población la constituyen los macrófagos inflamatorios, los cuales derivan de los monocitos circulantes, que se infiltran rápidamente en los tejidos comprometidos por una lesión o infección. Este tipo de macrófago se encarga de eliminar los restos celulares, células muertas, materiales y antígenos foráneos, de orquestar los procesos inflamatorios y de reclutar nuevos macrófagos a los lugares de la inflamación (Hume, Irvine, y Pridans 2019).

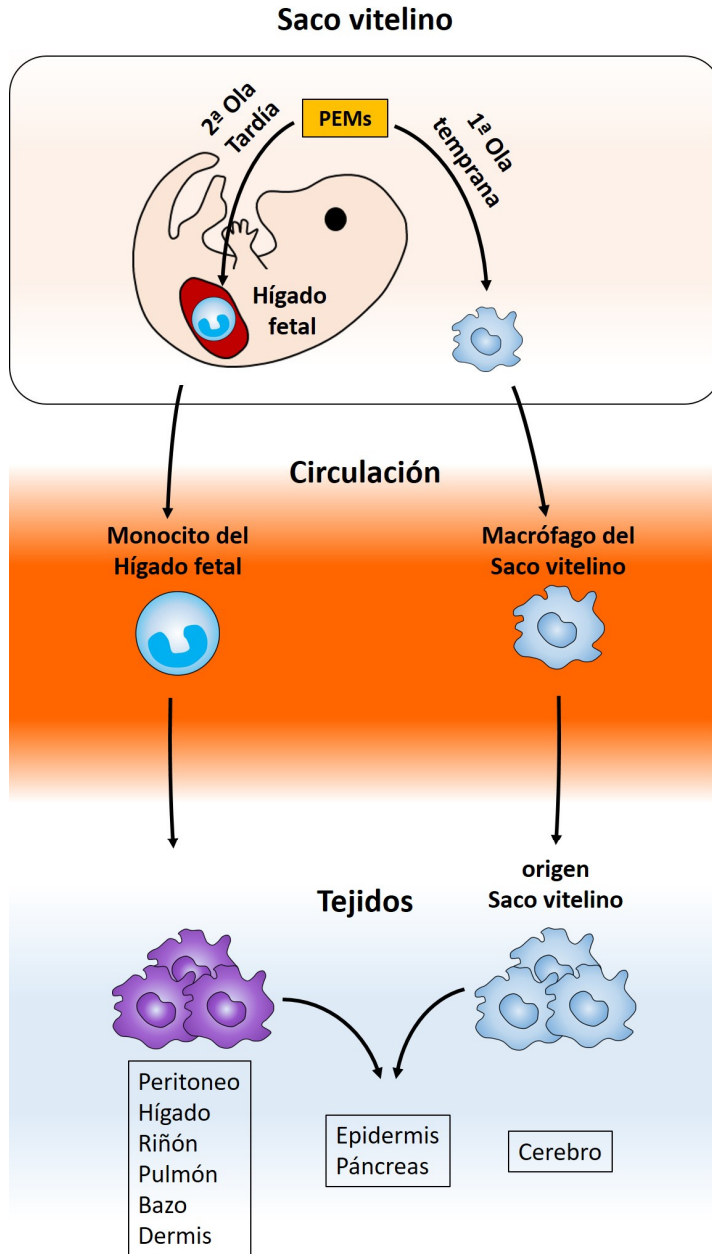


Figura 3. Origen embrionario de los macrófagos.
(Modificado de Udalova I.A. et al, Nature Reviews. 2016)

Introducción

Los macrófagos activados por los estímulos del microambiente adquieren un fenotipo específico, estableciendo distintos grupos o subpoblaciones de macrófagos dependiendo del tipo de estímulo que reciben, que dará forma a la respuesta del macrófago, promoviendo o frenando la defensa y la respuesta inflamatoria del hospedador. Dependiendo de la diversidad de los estímulos del microambiente, de la cantidad de citoquinas producidas y de la duración de la exposición, los macrófagos desarrollarán funciones específicas, donde cada subpoblación mostrará un estado muy particular de polarización. De manera habitual, esta polarización del macrófago ha sido agrupada en dos fenotipos principales, el macrófago activado clásicamente (macrófago M1), cuya función principal es la de promover la respuesta inflamatoria y mediar en la defensa del hospedador frente a una gran variedad de patógenos, y en la inmunidad antitumoral. El segundo estado de polarización es la del macrófago activado alternativamente (macrófago M2), que media en la resolución de la respuesta inflamatoria y controla la reparación y cicatrización de los tejidos (Atri, Guerfali, y Laouini 2018).

1.7. Los neutrófilos.

Los neutrófilos, también conocidos como leucocitos polimorfonucleares (PMN), son el tipo celular más abundante en la sangre. En condiciones de homeostasis, los neutrófilos son generados a partir de las HSC en la médula ósea, de donde son liberados después de su maduración para entrar en el torrente sanguíneo, lugar desde el que migran hacia los tejidos, donde desempeñan sus funciones, y donde finalmente son eliminados por los macrófagos. Los neutrófilos son células efectoras muy importantes para la inmunidad innata, siendo su principal función la de patrullar continuamente el organismo en busca de algún signo de infección microbiana (Mayadas, Cullere, y Lowell 2014). Cuando detectan algún tipo de señal indicadora de infección, los neutrófilos responden muy

rápidamente para atrapar y matar a los patógenos invasores. Se le reconocen tres mecanismos antimicrobianos principales: la fagocitosis, la desgranulación y la liberación de material nuclear en forma de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) (Rosales 2018).

Cuando el neutrófilo se encuentra con un microorganismo, lo fagocita y después de ser encapsulado en el fagosoma, la célula lo destruye usando mecanismos dependientes de la NADPH oxigenasa (especies reactivas de oxígeno, ROS), o mediante proteínas antibacterianas (catepsinas, defensinas, lactoferrina y lisozima). En el mecanismo de desgranulación, proteínas antibacterianas, son liberadas de los gránulos de los neutrófilos en los fagosomas o en el medio extracelular, actuando así sobre patógenos intra o extracelulares, respectivamente. Los neutrófilos activados también pueden eliminar los microorganismos extracelulares mediante la liberación de NETs. Las NET están compuestas por un elemento central de DNA, al que se unen histonas, proteínas (como la lactoferrina y las catepsinas) y enzimas (como la Mieloperoxidasa (MPO) y la elastasa de neutrófilos) que son liberadas a partir de los gránulos de neutrófilos. De esta manera inmovilizan a los microorganismos, impidiendo que se propaguen, y facilitando su posterior fagocitosis (Kolaczkowska y Kubes 2013) (**Figura 4**).

1.8. La respuesta inflamatoria.

La respuesta inflamatoria es un mecanismo de defensa frente a las señales de daño que percibe el organismo (Medzhitov 2010), que está constituido por un componente celular y otro molecular, capaces de minimizar de manera eficiente las infecciones o lesiones que sufre el organismo, e iniciar los procesos de reparación que reestablecen las condiciones de homeostasis y resuelven la inflamación aguda (Ferrero-Miliani et al. 2007). Sin embargo, cuando fallan los mecanismos de control de la respuesta inflamatoria, esta puede volverse crónica, contribuyendo a

Introducción

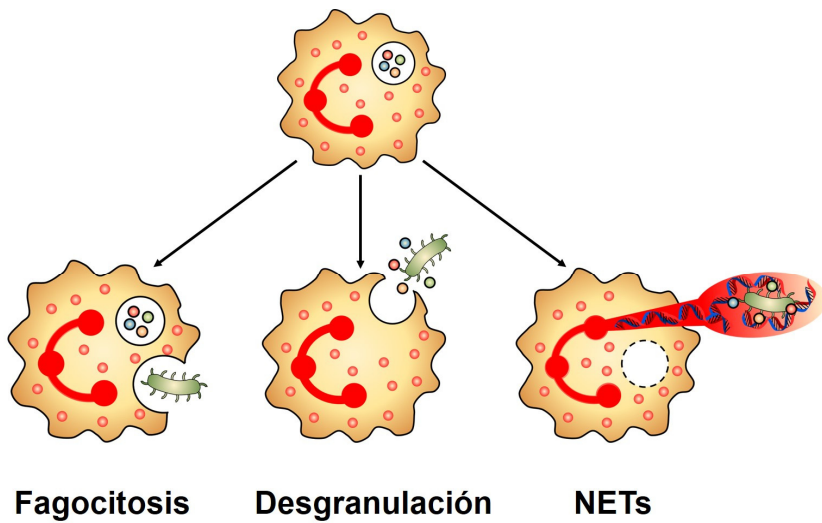


Figura 4. Mecanismos de defensa del neutrófilo.

(Modificado de Kolaczkowska, E. et al, Nature Reviews 2013)

una gran variedad de enfermedades inflamatorias (Ying Zhou, Hong, y Huang 2016).

A nivel tisular, la inflamación viene caracterizada por un enrojecimiento, hinchazón, y producción de calor y de dolor en la zona del tejido afectada, como resultado de las acciones de las células vasculares e inflamatorias locales en la zona de la lesión (Takeuchi y Akira 2010). Los eventos que tienen lugar durante el proceso inflamatorio conllevan cambios en la permeabilidad vascular, el reclutamiento y acumulación de leucocitos y la liberación de mediadores inflamatorios (Chertov et al. 2000; Ferrero-Miliani et al. 2007).

1.9. Mecanismos de la respuesta inflamatoria.

La respuesta inflamatoria conduce a la activación de manera coordinada, de diferentes vías de señalización que regulan los niveles de mediadores inflamatorios, liberados por las células tisulares e inflamatorias reclutadas a la zona de la inflamación (Lawrence 2009). La inflamación puede llegar a ser una patología común en muchas enfermedades crónicas, entre las que se incluyen enfermedades cardiovasculares, intestinales, diabetes, artritis reumatoide y cáncer (Libby 2007). Todos los procesos inflamatorios comparten un mecanismo de acción común, que se desarrolla en cuatro fases: En la primera fase, los PRRs de la superficie celular o endógenos reconocen los estímulos perjudiciales; En la segunda fase, se activan las vías de señalización inflamatorias; En la tercera fase, se liberan mediadores inflamatorios; y en la cuarta fase, se reclutan células inflamatorias a la zona afectada.

1.10. Receptores de Reconocimiento de Patrón (PRRs).

Determinadas estructuras moleculares microbianas muy conservadas, denominadas PAMPs, pueden desencadenar la respuesta

Introducción

inflamatoria a través de la activación de receptores PRRs específicos, codificados en la línea germinal, que son expresados tanto en células inmunes y no inmunes. Algunos PRRs son capaces de reconocer determinantes moleculares endógenos específicos, producidos durante el daño tisular o celular, conocidos como DAMPs (Gudkov, Gurova, y Komarova 2011). Los DAMPs pueden iniciar y perpetuar una respuesta inflamatoria no infecciosa (Seong y Matzinger 2004). Las células dañadas también pueden activar células inflamatorias innatas en ausencia de patógenos mediante la liberación de DAMPs (Ozinsky et al. 2000).

1.11. Receptores “Tipo Toll” (TLRs).

Los TLRs son receptores localizados y distribuidos a lo largo de la membrana plasmática, o en estructuras endógenas (fagosomas) de las células del sistema inmune innato, como los macrófagos y las DC, o incluso en células no inmunocompetentes como las células epiteliales, endoteliales y los fibroblastos. Estos receptores permiten detectar la presencia de moléculas relacionadas con organismos patógenos y activar aquellas vías que son necesarias para establecer una respuesta efectora contra dichos organismos.

Los receptores TLRs, están constituidos por glicoproteínas transmembrana, que se caracterizan por tener un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. El dominio extracelular es el encargado del reconocimiento de los componentes bacterianos o víricos (denominados ligandos). Este dominio presenta una estructura similar al de una herradura, que dispone de una región situada en la cara cóncava interna, constituida por repeticiones ricas en leucina (Kobe y Kajava 2001). La variación que presenta esta región rica en leucina, entre los diferentes TLRs, se piensa que es la que proporciona especificidad a cada ligando de TLR (Jin et al. 2007; L. Liu et al. 2008).

El dominio intracelular de los receptores TLRs, contiene una región de homología TLR/IL1R (TIR). En la unión del ligando a los receptores TLRs, estos pueden homo o heterodimerizar, reclutando moléculas adaptadoras a través de las interacciones TIR-TIR. Estos dominios intracelulares TIR son fundamentales para la transducción de señales, y cada uno de los diferentes conjuntos de moléculas adaptadoras que son reclutadas hasta estos dominios, explican de manera parcial, las diferentes salidas transcripcionales que dirige la señalización de cada TLR que es activado por su correspondiente ligando.

El espacio extracelular es un lugar crítico para la detección de patógenos por el sistema inmune innato, es por esto que los PRRs se encuentran dispuestos en la membrana plasmática hacia afuera para servir a este propósito, y así poder detectar componentes estructurales de organismos invasores extraños. Dentro de la familia de los receptores TLRs, los miembros TLR1, 2, 4, 5 y 6 reconocen diferentes componentes estructurales presentes en la superficie externa de los microorganismos, y señalizan desde la superficie de la membrana plasmática, como por ejemplo el Lipopolisacárido (LPS), que está presente en las bacterias gram negativas (TLR4) o el Zymosan, un glucano presente en la pared de los hongos (TLR2) (Brubaker et al. 2015).

Sin embargo, muchos microorganismos patógenos utilizan la vía endocítica para infectar a las células hospedadoras, como ocurre en el caso de algunas bacterias (*Mycobacterium tuberculosis*), que modifica los fagolisosomas y se hospeda en ellos (Zhai et al. 2019), o algunos virus que aprovechan las condiciones de pH, para inducir la fusión de la membrana y obtener acceso al citosol. Por estas razones, la ruta endocítica también es una ubicación ideal para que residan algunos de los receptores de la inmunidad innata, ya que están bien posicionados para detectar los ligandos bacterianos o víricos liberados durante la degradación hidrolítica

Introducción

o la entrada viral. Dentro de este grupo se incluyen TLR3, 7 y 9, que reconocen componentes virales como RNA de doble cadena, CpGs o RNA de cadena sencilla respectivamente y señalizan desde estructuras intracelulares como los fagosomas, con la excepción de TLR4, que es capaz de señalizar desde ambas posiciones (Brubaker et al. 2015).

De todos los miembros de la familia TLR, TLR4 es el mejor caracterizado funcionalmente. La señalización de TLR4 en respuesta a la unión del LPS requiere de un complejo multireceptor, que está constituido por la proteína de unión al LPS (LBP), CD14 y MD-2, que actúan de manera secuencial, para extraer el LPS de las bacterias y promover la señalización a través del receptor TLR4. LBP es una molécula soluble que se puede unir a agregados de LPS, como los que se encuentran presentes en la pared de las bacterias gram negativas. Con la ayuda de la albúmina, LBP facilita de alguna manera la transferencia de los monómeros de LPS hacia CD14 (Eckert et al. 2013). Posteriormente, CD14 transfiere el LPS a MD-2, una proteína plegada en hoja beta, con un bolsillo hidrófobo que se une al LPS con alta afinidad (Park et al. 2009). MD-2 es requerido para la dimerización y la señalización intracelular de TLR4 en respuesta al LPS.

Todos los TLR usan la proteína adaptadora MyD88 para la transducción de señales, con la excepción de TLR3, lo que resalta su importancia en la señalización. MyD88 interactúa con TIRAP o con TLR directamente a través de un dominio TIR carboxilo terminal. Tras la activación de TLR4, MyD88 se oligomeriza para formar un gran complejo de señalización llamado myddosoma, que incorpora de 6 a 8 moléculas de MyD88, TIRAP y los miembros de la familia IRAK (Bonham et al. 2014; Lin, Lo, y Wu 2010; Motshwene et al. 2009) (**Figura 5**).

IRAK4 es el primer miembro de la familia en ser reclutado al myddosoma, y su actividad quinasa es esencial para la transducción de

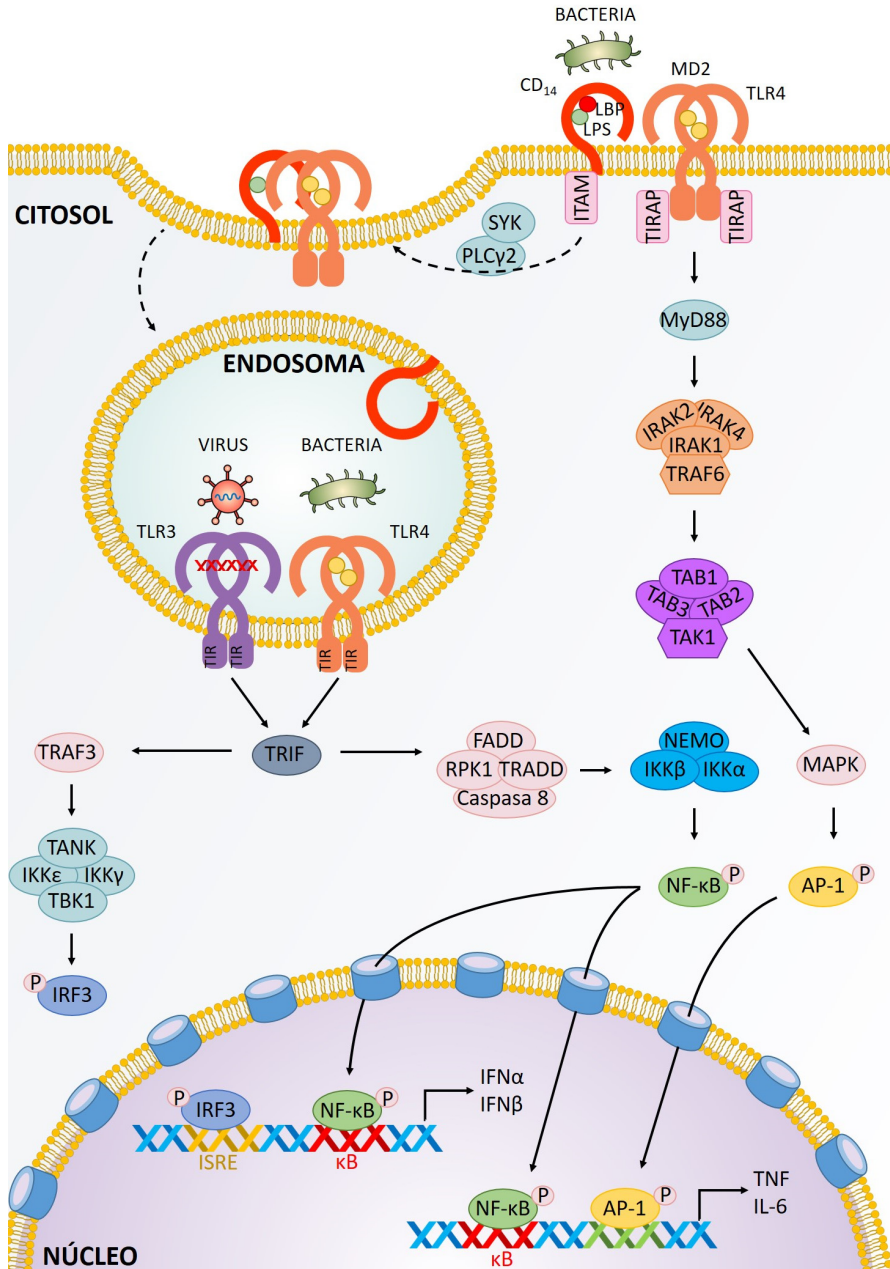


Figura 5. Vías de señalización de los receptores TLRs.

(Modificado de Ming-Ming, H. et al, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2018 & Brubaker, S.W. et al, Annu. Rev. Immunol. 2015)

Introducción

señales y la activación de IRAK1 e IRAK2 (Kawagoe et al. 2008; Suzuki et al. 2002). Tras la fosforilación de IRAK4, IRAK1 e IRAK2 interactúan con MyD88 y el factor 6 asociado con el receptor de TNF (TRAF6), para regular la activación de NF- κ B (Cao et al. 1996; Kawagoe et al. 2008; Muzio et al. 1997). TRAF6 es una ligasa de ubiquitina E3 capaz de generar cadenas de poliubiquitinación unidas a K63 (Deng et al. 2000). Estas cadenas híbridas de ubiquitinación reclutan complejos quinasas preexistentes, constituidos por TAK1, TAB1, TAB2 y TAB3. Este complejo a su vez controla la activación de la quinasa I κ B (IKK) y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), las cuales en último lugar controlan la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, respectivamente (Emmerich et al. 2013).

Desde el segundo sitio de señalización, el endosoma, TLR4 controla dos respuestas importantes: una onda tardía de activación de NF- κ B (Horng y Medzhitov 2001) y la producción de interferón de tipo I (IFN α/β). En la señalización de TLR4 desde el endosoma, TRAM y TRIF controlan la activación tardía de NF- κ B y la producción de IFN α/β (Yamamoto, Sato, Hemmi, Hoshino, et al. 2003; Yamamoto, Sato, Hemmi, Uematsu, et al. 2003). La presencia de TRAM en los endosomas es absolutamente necesaria para la señalización de TRAM/TRIF, aunque el movimiento de TRAM de la membrana plasmática a los endosomas es independiente del movimiento de TLR4 a los endosomas mediado por CD14. Se ha especulado que una vez que alcanza el endosoma, TIRAP es desplazado del dominio TIR de TLR4 mediante TRAM, lo que permite que la ruta dependiente de TRIF se active (Enokizono et al. 2013; Kagan et al. 2008; Piao et al. 2013). El mecanismo por el cual se produce la activación de NF- κ B en la etapa tardía dependiente de TRIF no está claro, pero varios estudios han demostrado interacciones bioquímicas o funcionales entre TRIF y la proteína quinasa 1 (serina/treonina) que interactúa con el receptor (RIPK1), la proteína con un Dominio Dead (DD) asociada con el

receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1 (TRADD) y la caspasa-8, que promueven la activación de NF- κ B (**Figura 5**). TRIF también controla la producción de IFN α/β mediada por IRF3 a través del reclutamiento del factor 3 asociado con el receptor de TNF (TRAF3). TRAF3 interactúa con el activador de NF- κ B asociado a TRAF (TANK) o proteínas relacionadas con TANK (Häcker et al. 2006) para reclutar la quinasa 1 de unión a TANK (TBK1) e IKK ϵ que activan IRF3, regulando así la producción de IFN α/β (Fitzgerald, McWhirter, et al. 2003; Hemmi et al. 2004; McWhirter et al. 2004). La respuesta transcripcional completa inducida por TLR4 a partir de los endosomas requiere de la activación de NF- κ B en una etapa tardía y la producción de IFN α/β endosomal (K. E. Thomas et al. 2006).

TLR3 también es capaz de activar la señalización dependiente de TRIF, pero a diferencia de TLR4, este proceso no requiere de TRAM (**Figura 5**) (Fitzgerald, McWhirter, et al. 2003; Fitzgerald, Rowe, et al. 2003). En este caso, el dominio TIR de TLR3 tiene una alta afinidad por el dominio TIR de TRIF (Brown et al. 2006; Ulrichs et al. 2007) y es capaz de unirse directamente a este. El motivo por el cual la señalización dependiente de TLR3, no necesita de TRAM no está claro, pero podría estar relacionado con la necesidad de que TLR4 requiera de diferentes moléculas adaptadoras para señalizar en diferentes compartimentos.

1.12. Regulación de la respuesta inflamatoria.

Durante la diferenciación del macrófago en la respuesta inflamatoria, la estructura del genoma sufre una serie de modificaciones que permiten la reprogramación de la célula para iniciar una respuesta efectora apropiada al desafío al que se enfrenta. Cada tipo celular que participa en la respuesta inmune innata, entre los que se incluyen las diferentes subpoblaciones de macrófagos y células dendríticas, se caracterizan por tener respuestas transcripcionales distintas a un mismo estímulo específico, y por lo tanto definen funciones biológicas únicas para cada tipo

Introducción

celular (Smale, Tarakhovsky, y Natoli 2014). Existe una relación muy próxima entre los eventos moleculares que se suceden durante la diferenciación de un tipo celular determinado y la especificidad de su respuesta efectora frente a un estímulo específico. Esta relación se explica a través de dos mecanismos: En el primero de ellos, determinadas proteínas, que juegan un papel directo en respuesta a estímulos específicos, como determinados receptores, proteínas transductoras de señales y factores de transcripción, son expresados de manera específica por un tipo celular dado, durante su diferenciación (Gilmore y Gerondakis 2011; Smale 2012). En un segundo mecanismo, regiones genómicas reguladoras ligadas a genes cuya expresión es inducida a través de estímulos específicos, están controlados directamente por factores de transcripción determinantes de linaje (LDTFs), a menudo expresados en un estadio temprano de la diferenciación, lo que hace que esos genes que controlan sean susceptibles de ser inducidos, cuando la célula diferenciada es estimulada (Natoli 2010; Natoli, Ghisletti, y Barozzi 2011).

La estructura de la cromatina parece desempeñar un papel crucial en los eventos que tienen lugar en las regiones reguladoras del genoma durante la diferenciación. La expresión de genes específicos de señal se logra a través de la regulación de regiones promotoras y reguladoras, colectivamente llamadas "elementos reguladores en cis", a nivel de genes individuales. Estos elementos genómicos deben interpretarse dentro del contexto de la cromatina, cuya unidad básica estructural es el nucleosoma. Cada nucleosoma está constituido por un octámero de dos copias de las histonas H2a, H2b, H3 y H4 rodeadas aproximadamente por dos vueltas de DNA (unos 146 pares de bases). Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN tienen una determinada afinidad por el octámero de histonas, que aumenta con una abundancia creciente de residuos de guanina y citosina (Struhl y Segal 2013), hasta un determinado punto a partir del cual, la gran abundancia de estos residuos no favorece el

ensamblaje del nucleosoma. De hecho, la alta concentración de residuos de guanina y citosina en las islas CpG, que representan el 70% de las regiones promotoras de los genes de mamíferos, interfiere con el ensamblaje del nucleosoma y, por lo tanto, explica la ausencia de nucleosomas en estas regiones (Barozzi et al. 2014; Fenouil et al. 2012; Ramirez-Carrozzi et al. 2009). Los sitios de unión para los factores de transcripción dentro de las regiones reguladoras en cis, se encuentran integradas dentro de secuencias que presentan una alta afinidad por los nucleosomas (Lidor Nili et al. 2010), lo que sugiere que los factores de transcripción deben de competir con los nucleosomas para obtener acceso a las secuencias de DNA reguladoras. (**Figura 6**).

Cada histona dentro del octámero puede ser alterada por diferentes modificaciones postraduccionales, que se producen principalmente en los residuos de sus extremos amino terminales, conocidos como "colas de histonas" (Gardner, Allis, y Strahl 2011). Estas modificaciones específicas, están asociadas a diferentes estados funcionales de la cromatina, sin embargo, la función precisa que desempeñan solo se entiende parcialmente (Smale, Tarakhovsky, y Natoli 2014), aunque existen evidencias que indican que esas modificaciones muestran un papel importante en la regulación de la respuesta celular (Chan et al. 2015; Nicodeme et al. 2010).

Las regiones promotoras se caracterizan por mostrar una mayor presencia de la marca de trimetilación en la Lys4 de histona H3 (H3K4me3), que de la marca de monometilación de la H3K4 (H3K4me1) o dimetilación de H3K4 (H3K4me2), mientras que las regiones reguladoras, muestran niveles altos de H3K4me1. Por otra parte, la acetilación de los residuos de lisina, entre las que se incluyen la histona H3 Lys9 (H3K9ac) o Lys27 (H3K27ac), la histona H4 Lys5 (H4K5ac), Lys8 (H4K8ac) o Lys12 (H4K12ac), se asocian con regiones promotoras y reguladoras activas

Introducción

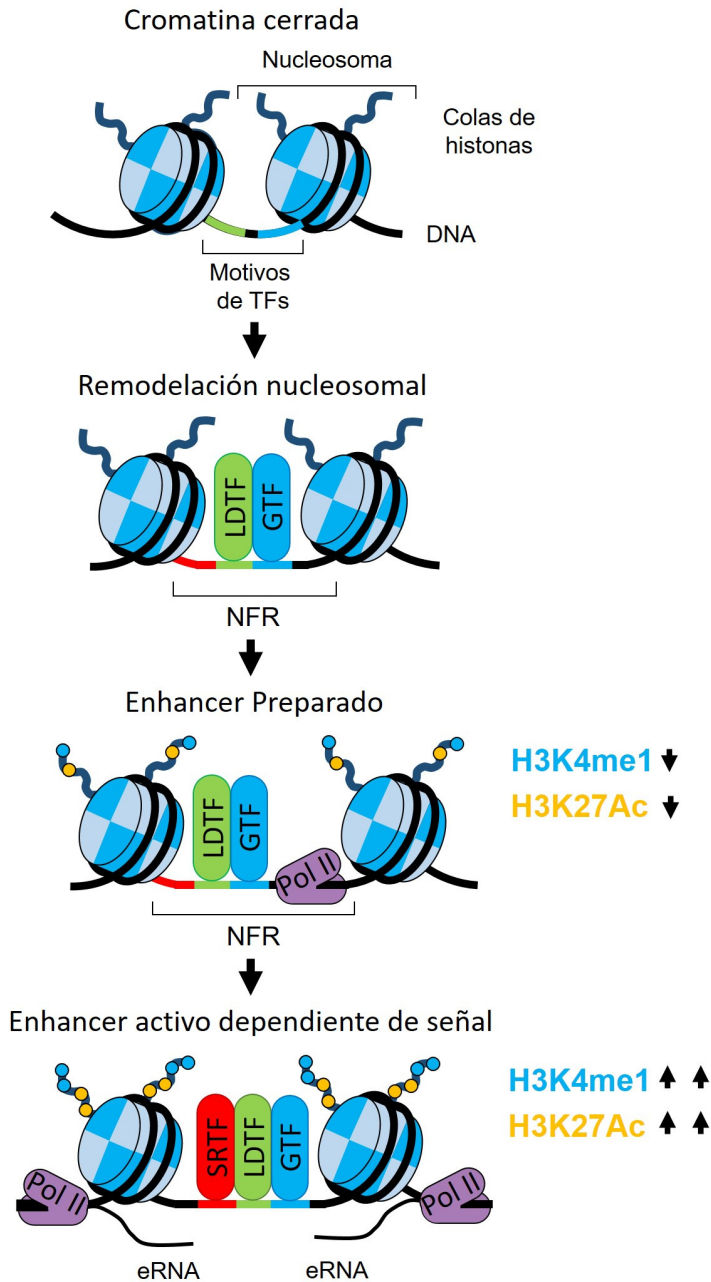


Figura 6. Selección y activación de enhancers específicos de tipo celular.

(Modificado de Zhang, D.X. et al, Journal of Molecular Endocrinology 2013)

transcripcionalmente. Por el contrario, las modificaciones de histonas asociadas con la represión transcripcional incluyen la trimetilación de H3 Lys27 (H3K27me3) y H4 Lys20 (H4K20me3).

La gran mayoría de las regiones reguladoras, se caracterizan por presentar nucleosomas que contienen niveles relativamente altos de la marca H3K4me1, depositados por enzimas metiltransferasas de histonas (HMTs) (Heintzman et al. 2007). El papel funcional de H3K4me1 todavía no está bien definido, pero parece estar involucrado en interacciones con proteínas que estabilizan la unión a la cromatina de algunas enzimas acetiltransferasas de histonas (HATs) (Jeong et al. 2011). Las regiones reguladoras activas, representan tan solo un subconjunto relativamente pequeño de todo el repertorio de regiones reguladoras disponibles y preparadas para la actividad en un tipo celular determinado (Creighton et al. 2010; Ostuni et al. 2013; Rada-Iglesias et al. 2011). Estas regiones también se encuentran asociadas con p300 (Heintzman et al. 2007, 2009), una proteína de alto peso molecular, que posee un dominio acetiltransferasa de histonas (J. Chen y Li 2011). p300 y su homóloga, la proteína de unión a CREB (CBP), pueden ser reclutadas a regiones reguladoras y regiones promotoras a través de una amplia gama de factores de transcripción, para promover la activación transcripcional mediante la acetilación de las colas de histonas en esas regiones.

Los elementos reguladores en cis consisten en combinaciones de secuencias de unión para TFs específicos, agrupados dentro de una región de unos 150-200 nucleótidos (Sven Heinz et al. 2015). La organización estructural del nucleosoma, proporciona una barrera física para la unión de TFs al DNA. De los cientos de factores de transcripción específicos expresados por una célula, solo una pequeña fracción es capaz de unirse a esas secuencias en el contexto del nucleosoma (Iwafuchi-Doi y Zaret 2016). Estos TFs a menudo se denominan "factores pioneros" y coinciden

Introducción

en gran medida con los LDTF (**Figura 7**), es decir, los factores de transcripción que determinan “la selección” del destino celular.

Dado que las secuencias reguladoras en cis tienen una alta afinidad por las histonas nucleosomales (Barozzi et al. 2014; Lidor Nili et al. 2010) y, por lo tanto, están parcialmente ocluidas, la unión efectiva al DNA requiere de la combinación adecuada de secuencias de unión para TFs, con actividad "pionera", que se expresan de manera dependiente del tipo celular. Análisis bioinformáticos de regiones reguladoras marcadas por H3K4me1, revelaron una elevada prevalencia de sitios de unión para PU.1, un miembro de la familia ETS de TFs, restringido a células del sistema hematopoyético, esencial para el desarrollo de macrófagos y células B. PU.1 se puede unir a regiones reguladoras asociadas con estructuras inaccesibles de la cromatina, y promover cambios en ellas, que permitan la unión de otros factores de transcripción para activar la expresión de genes vinculados a esas regiones (Smale 2010; Zaret y Carroll 2011). En estudios realizados por Ghisletti y otros colaboradores, se demostró que PU.1 posee propiedades que le sugieren un papel como “factor pionero” (Ghisletti et al. 2010; Sven Heinz et al. 2010). En particular, la expresión de PU.1 en fibroblastos o en precursores mieloides que carecen de ese TF, fue suficiente para la deposición de marcas de H3K4me1 y para los cambios físicos sufridos en la organización de la cromatina, específicamente el desplazamiento de los nucleosomas presentes en las regiones reguladoras. Estos datos sugieren que PU.1, quizás en combinación con otros LDTFs, obtienen acceso a secuencias de unión en una etapa temprana de la diferenciación de los macrófagos y reclutan complejos de proteínas que metilan las colas de la histona H3 en la posición K4 en las regiones reguladoras, alterando la cromatina para hacerla accesible a factores de transcripción de respuesta a señales (SRTFs).

Una observación importante que surgió del estudio de la expresión de genes dependientes de señal en macrófagos, es que muchas regiones reguladoras que existen inicialmente en un estado denominado “preparado”, caracterizado por la presencia de H3K4me1 y la ausencia de H3K27ac, pueden pasar a un estado denominado “activo”, al adquirir ambas marcas de histonas, de una manera dependiente de señal (Ghisletti et al. 2010; S. Heinz et al. 2013; Kaikkonen et al. 2013). Además, estudios de inmunoprecipitación de cromatina acoplado a secuenciación (ChIP-Seq) de varios SRTF, entre los que se incluyen NF- κ B, STAT y receptores nucleares, indican que la mayoría de los eventos de unión al DNA dependientes de señal, ocurren en regiones genómicas accesibles, muchas de las cuales exhiben características de regiones reguladoras “preparadas” o “activas” (Barish et al. 2010; Ghisletti et al. 2010; S. Heinz et al. 2013; Kaikkonen et al. 2013) (**Figura 6**). La unión de TFs a regiones reguladoras próximas a genes cuya expresión es inducida, generalmente están asociadas con una ganancia de la marca de histonas H3K27ac, consistente con el reclutamiento local de enzimas HATs, que promueven la transición de las regiones reguladoras de un estado “preparado” a un estado “activo” (Ghisletti et al. 2010; S. Heinz et al. 2013; Kaikkonen et al. 2013). La unión de los SRTF se produce principalmente en regiones reguladoras ya existentes, sin embargo, algunos estímulos promueven la unión de un pequeño porcentaje de dichos TFs a regiones del genoma inaccesibles, que conllevan la adquisición de modificaciones de histonas asociadas a esas regiones reguladoras (Kaikkonen et al. 2013; Ostuni et al. 2013), denominadas regiones reguladoras “latentes” o “de novo”. La unión de SRTF en esas regiones, ocurre de manera dependiente de la unión de LDTF de macrófagos (Kaikkonen et al. 2013; Ostuni et al. 2013), por lo tanto, actuando como acompañantes obligatorios en estos sitios. Sin embargo, no todos los SRTF pueden unirse y modificar regiones que no hayan sido marcadas previamente por PU.1 y C/EBP. En respuesta al LPS, AP-1 e IRF8 pueden tener un papel dominante en la apertura de regiones

Introducción

genómicas previamente inaccesibles. De hecho, una gran fracción de los eventos de unión de IRF8 inducidos por LPS, ocurren en regiones carentes de la unión de PU.1 (Mancino et al. 2015). En particular, muchas de estas regiones reguladoras “latentes” o de “novo”, conservan esas modificaciones sufridas en las colas de las histonas una vez que es retirado el estímulo inicial, asociándose a una respuesta más rápida y más fuerte, cuando se produce una reestimulación, que la que tuvo lugar durante la estimulación primaria (Ostuni et al. 2013). Estas observaciones sugieren que la deposición de las modificaciones de histonas proporciona una memoria epigenómica del estímulo anterior, que facilita las respuestas posteriores.

2. Superfamilia de receptores nucleares.

La superfamilia de NRs, está constituida por numerosos factores de transcripción, que desempeñan funciones relacionadas con el metabolismo, la inmunidad, el desarrollo embrionario o la reproducción. Aunque la gran mayoría de estos factores de transcripción se encuentran regulados por metabolitos endógenos de origen lipídico, como las hormonas esteroideas, metabolitos derivados del colesterol, los fosfolípidos y ácidos retinoides, actualmente todavía existen algunos miembros de esta familia, de los cuales se desconoce que metabolitos los activan, siendo denominados miembros “huérfanos”. Todos los miembros de esta superfamilia de NRs, comparten la característica de reconocer y unirse a secuencias específicas del DNA, donde reclutan proteínas correguladoras y remodeladoras de la cromatina, necesarias para la activación o represión de la expresión de sus genes diana.

El receptor del glucocorticoide fue el primer NR descubierto en 1985, y desde entonces, la familia de NRs se ha ido incrementando, a medida que se han descubierto nuevos miembros, llegando a formar parte de ella hasta 48 miembros en humanos (Weikum, Liu, y Ortlund 2018). Hoy en día

se conocen numerosas patologías asociadas a actividades aberrantes de los miembros de esta familia de NRs como el cáncer, la diabetes y la inflamación crónica (Gustafsson 1998), es por ello que los NRs son objeto de estudio como potenciales dianas terapéuticas.

2.1. Estructura de los Receptores Nucleares.

Estudios de las estructuras cristalinas de los NRs han determinado que casi todos los miembros de esta superfamilia comparten una estructura modular muy similar (P. Huang, Chandra, y Rastinejad 2010; Fraydoon Rastinejad et al. 2013). La arquitectura principal de los NRs está compuesta de cinco módulos o dominios (enumerados de la A hasta la H), donde cada uno de estos dominios desempeña una función específica en la actividad del NR (Pawlak, Lefebvre, y Staels 2012) (**Figura 7**).

- **A / B: Dominio N-terminal (NTD):** El NTD es un dominio en el que existe muy poca conservación en la secuencia de aminoácidos entre los diferentes miembros de la superfamilia de NRs, por lo que existe una gran variedad en el tamaño de este dominio (**Figura 7**). Este dominio contiene una región denominada función activadora 1 (AF-1), que interactúa con numerosas proteínas correguladoras de manera dependiente del tipo celular y de la región reguladora a la que se une en el genoma (R. Kumar y Thompson 2003). Esta región es susceptible de sufrir modificaciones postraduccionales, entre las que se incluyen la fosforilación, sumoilación y acetilación (Anbalagan et al. 2012).
- **C: Dominio de unión al DNA (DBD):** Este es el dominio más conservado entre todos los NRs (Robinson-Rechavi y Laudet 2003). El DBD está constituido a su vez por dos subdominios que contienen cuatro residuos de cisteína que coordinan un ion zinc para crear un motivo canónico denominado “dedo de zinc”, a través del cual se une al DNA (Gronemeyer y Moras 1995).

Introducción

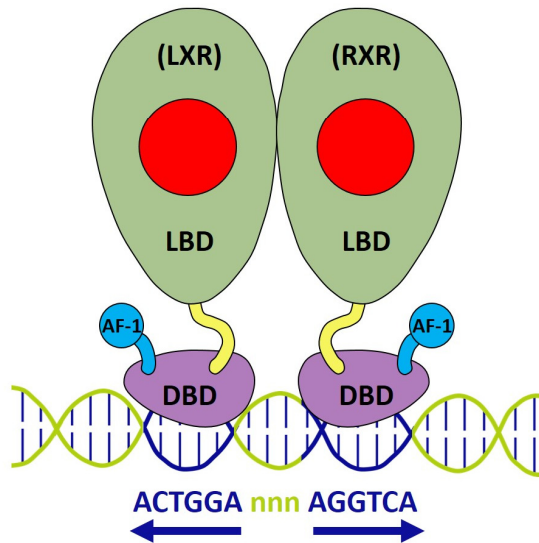
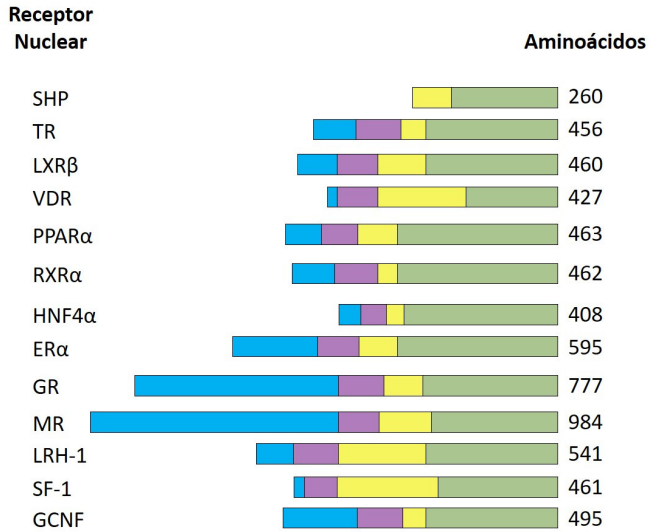
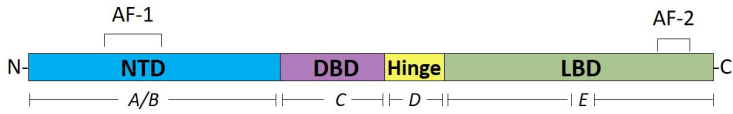


Figura 7. Estructura de los miembros de la superfamilia de receptores nucleares.
(Modificado de Weikum, E.R. Protein Science 2018)

- **D: Región bisagra:** La región bisagra es una región corta y flexible que hace de conexión entre el DBD y el dominio de unión al ligando (LBD) (Pawlak, Lefebvre, y Staels 2012). Esta región es la que presenta la secuencia más corta en tamaño y menos conservada entre todos los NRs.
- **E: Dominio de unión a ligando (LBD):** El LBD es un dominio complejo de señalización alostérico, en el que además de interactuar con el ligando, también interactúa directamente con proteínas correguladoras (Moras y Gronemeyer 1998; Weatherman, Fletterick, y Scanlan 1999). Este dominio está bastante conservado estructuralmente, y normalmente suele estar constituido por hélices α y hojas β que se pliegan en capas paralelas para formar un sándwich alfa helicoidal (Wurtz et al. 1996). Este pliegue crea un bolsillo de unión al ligando hidrófobo en la base del receptor (Johnson et al. 2000; Moras y Gronemeyer 1998; Nolte et al. 1998). El LBD contiene otra región denominada función activadora 2 (AF-2), que se compone de las hélices 3, 4 y 12. La hélice 12, también denominada función activadora de hélice (AF-H), ha demostrado ser conformacionalmente dinámica al unirse el ligando, alterando la orientación de AF-2 para facilitar la interacción con diferentes proteínas correguladoras (Moras y Gronemeyer 1998; Wurtz et al. 1996).

2.2. Interacción de los Receptores con sus ligandos.

Los NRs tienen la capacidad de reconocer y de unirse a una gran variedad de pequeños metabolitos, de origen lipídico, como hormonas, lípidos y ácidos retinoides, que difunden o son transportados a través de la membrana plasmática (Xu y Lambert 2003). En ausencia de ligando, los NRs tienden a ser inestables, sin embargo, la unión del ligando al NRs aumenta considerablemente la estabilidad del LBD, y una menor degradación proteolítica observada en los NRs cuando estos se

Introducción

encuentran unidos al DNA y a sus ligandos, en comparación con aquellos que no lo están (Gee y Katzenellenbogen 2001; Johnson et al. 2000; Kallenberger et al. 2003; Keidel, LeMotte, y Apfel 1994). Esta estabilización, entre otros factores, facilita la unión de correguladores (Darimont et al. 1998).

Los ligandos se unen al receptor dentro del bolsillo de unión en la base del LBD. Este bolsillo se compone aproximadamente de un 75% de residuos hidrófobos, pero también contiene residuos polares que son críticos para que se lleven a cabo interacciones de puentes de hidrógeno con el ligando (Wurtz et al. 1996). Estos enlaces de hidrógeno ayudan a posicionar al ligando en la orientación correcta (**Figura 8**). Estas diferencias aseguran que los ligandos naturales estén unidos por el receptor correcto. La selección de ligandos se logra además por la diferencia existente en el tamaño de las cavidades de los LBDs entre los diferentes NRs (Egawa et al. 2016; He et al. 2014; Mi et al. 2003).

2.3. Interacción de los Receptores con el DNA.

Los DBD de los NRs se unen a diferentes secuencias o “elementos de respuesta” (REs) del DNA cuyas secuencias de nucleótidos pueden tomar la forma de un palíndromo, una repetición directa o un sitio monomérico, extendido (Gronemeyer y Moras 1995; Khorasanizadeh y Rastinejad 2001). Los receptores de esteroides (SR), se unen a repeticiones palindrómicas que contienen dos repeticiones de la secuencia AGGACA, separadas por una región espaciadora que varía en longitud. Se ha demostrado que la longitud de este espaciador modula de forma alostérica los SR, regulando programas transcripcionales muy variados (Schwabe, Chapman, y Rhodes 1995; Schwabe y Rhodes 1991). Sin embargo, la longitud del espaciador más común es de 3 pares de bases (Lefstin y Yamamoto 1998; Luisi et al. 1991; Meijnsing et al. 2009). Entre los NRs que se unen a repeticiones directas, se incluyen los heterodímeros RXR-RAR,

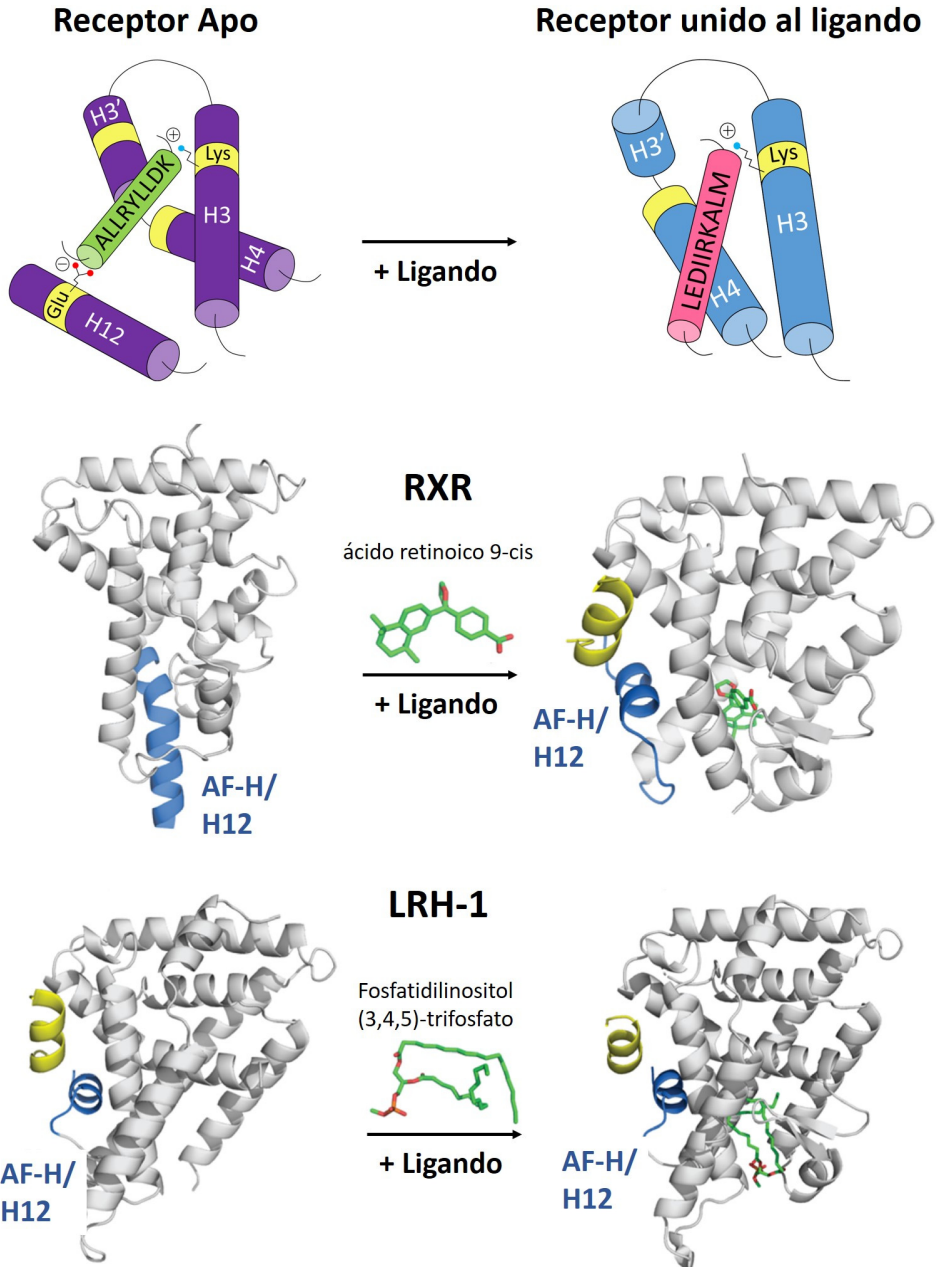


Figura 8. Interacción de miembros de la Superfamilia de Receptores Nucleares con el ligando.

(Modificado de Weikum, E.R. Protein Science 2018)

Introducción

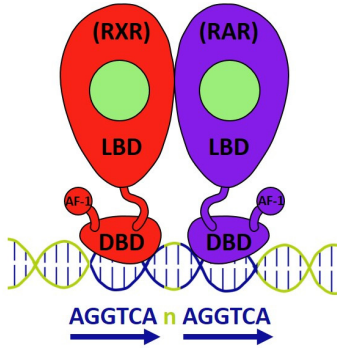
-LXR, -GCNF, o -VDR entre otros (Khorasanizadeh y Rastinejad 2001; F. Rastinejad et al. 1995). Estas repeticiones directas se componen de dos secuencias AGGTCA separadas por una secuencia espaciadora que varía entre 0 - 5 pares de bases de longitud. Finalmente, el homólogo del receptor hepático 1 (LRH-1) y el factor esteroideogénico 1 (SF-1), son ejemplos de receptores que se unen a secuencias monoméricas extendidas (Little et al. 2006; Weikum et al. 2016). Estas secuencias monoméricas extendidas contienen un sitio AGGTCA y una secuencia rica en A/T directamente en sentido ascendente (**Figura 9**).

2.4. Interacción de los Receptores con proteínas correguladoras.

Después de la unión al DNA, los NRs reclutan una gran variedad de proteínas conocidas colectivamente como correguladores (Lonard y O'malley 2007; Millard et al. 2013). Hasta la fecha, se conocen aproximadamente unas 200 proteínas correguladoras diferentes, que se clasifican en dos categorías principales: coactivadores y correpresores (Lonard y O'malley 2007; McKenna, Lanz, y O'Malley 1999). Éstas interactúan directamente con los NRs en las regiones AF-1 y AF-2 (R. Kumar y Thompson 2003).

La discriminación entre la unión del coactivador o del correpresor se ha relacionado con la flexibilidad conformacional de la hélice H12 de la región AF-2 (Nagy y Schwabe 2004; Wurtz et al. 1996). Originalmente, se planteó que, tras la unión del ligando, había un reordenamiento estructural de la hélice H12, lo que provocaba que este se cerrara de golpe, sin embargo, este fenómeno solo se observó en unas pocas proteínas (Brzozowski et al. 1997). El modelo actual, que es el "modelo de estabilización dinámica", sugiere que la hélice H12 no está en una posición fija, sino que es dinámica. La unión del ligando estabiliza la hélice en una conformación más fija (Pissios et al. 2000).

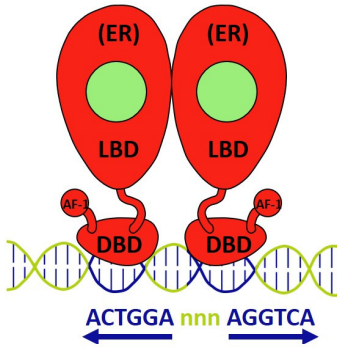
Repetición directa



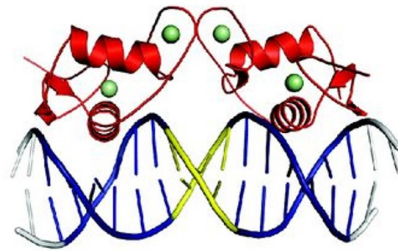
RXR-RAR (DR1)



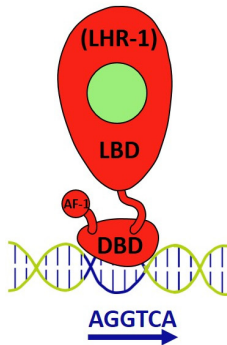
Repetición palindrómica



ER-ER (PAL3)



Medio sitio único extendido



LRH-1 (DR0)

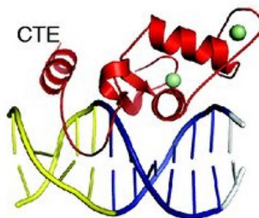


Figura 9. Interacción de los Receptores Nucleares con el DNA.

(Modificado de Rastinejad, F. et al, Journal of Molecular Endocrinology 2013)

Introducción

2.5. Regulación transcripcional mediada por Receptores Nucleares.

Los NRs modulan la actividad transcripcional a través de distintos mecanismos que finalmente resultan en la activación o la represión de programas genéticos específicos. La activación transcripcional tiene lugar una vez que se ha producido la unión del ligando al NR, estabilizándolo en un estado activado (Y. Li, Lambert, y Xu 2003). En este estado, los NRs reclutan proteínas coactivadoras, que inician la formación de grandes complejos de proteínas que contienen enzimas modificadoras de histonas como las HATs, o las HMTs (Bulyanko y O'Malley 2011; Gadaleta y Magnani 2014). Estas enzimas que conforman los complejos coactivadores, facilitan la apertura de la cromatina, haciéndola accesible a nuevas proteínas reguladoras. Finalmente, la maquinaria transcripcional y la RNA polimerasa II son reclutadas para iniciar la transcripción (Acevedo y Kraus 2004).

Por otra parte, los NRs pueden reprimir la actividad transcripcional mediante dos mecanismos diferentes. En el primero de ellos, los NRs pueden unirse a los correpresores en ausencia de ligando (Glass y Rosenfeld 2000). Estas proteínas correpresoras, reclutan enzimas modificadoras de histonas, como las histonas deacetilasas (HDACs) (Lonard y O'malley 2007), que actúan en sentido opuesto a como lo hacen las HATs, cerrando la cromatina, y por lo tanto bloqueando el acceso de la maquinaria transcripcional al DNA (Glass y Rosenfeld 2000; Tetel, Auger, y Charlier 2009). En el segundo mecanismo de acción, los NR pueden interactuar con REs "negativos" (Hudson, Youn, y Ortlund 2013; Surjit et al. 2011). La unión a estas secuencias hace que los NRs adopten una conformación diferente a la que adoptan cuando se unen a REs "positivos", lo que favorece el reclutamiento de correpresores para bloquear la transcripción.

2.6. Los Receptores X Hepáticos (LXRs).

Los LXRs son NRs que tienen funciones fundamentales en el control transcripcional del metabolismo de los lípidos. LXR funciona como un sensor biológico de oxisteroles, por lo que su actividad transcripcional se induce en respuesta a niveles celulares elevados del colesterol. Los LXRs se unen al DNA y regulan la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la absorción, transporte, flujo, excreción y conversión del colesterol en ácidos biliares. Las acciones coordinadas específicas de tejido, de la vía de señalización de LXR mantienen la homeostasis sistémica del colesterol y regulan las respuestas inmunitarias e inflamatorias. Los LXRs también ejercen efectos importantes sobre el metabolismo de los fosfolípidos, que, junto con el colesterol, son componentes principales de las membranas celulares. La capacidad de la vía de señalización de LXR para acoplar los niveles de esteroides celulares con la saturación de los ácidos grasos en los fosfolípidos de la membrana tiene implicaciones en numerosos procesos fisiológicos, incluyendo la producción de lipoproteínas, la absorción de lípidos en la dieta y la proliferación de células madre intestinales (B. Wang y Tontonoz 2018).

Por otra parte, al igual que ocurre con otros receptores nucleares, la activación de LXR tiene un papel antiinflamatorio, inhibiendo la actividad transcripcional dependiente de señal, de genes proinflamatorios regulados por NF- κ B, AP-1 y otros factores de transcripción. Se ha demostrado que los agonistas sintéticos de LXR mejoran la aterosclerosis y una amplia gama de trastornos inflamatorios en modelos animales preclínicos (Fessler 2018).

2.7. Tipos de receptores LXRs.

Los receptores LXR están presentes en dos isoformas, codificados por dos genes diferentes, LXR β (*Nr1h2*) y LXR α (*Nr1h3*) (Janowski et al.

Introducción

1999). La isoforma LXR α se expresa mayoritariamente en el hígado, en determinados macrófagos tisulares, y en menor medida, en el riñón, el intestino delgado, el bazo y la glándula suprarrenal (Apfel et al. 1994; Willy et al. 1995). Por el contrario, LXR β se expresa de forma ubicua (Song et al. 1995). LXR α consta de 447 aminoácidos (Willy et al. 1995), mientras que LXR β contiene 461 (Shinar et al. 1994). Las regiones DBD y LBD de LXR α y LXR β tienen 75.6% y 74% de identidad de secuencia, respectivamente (Tice et al. 2014). Tanto LXR α como LXR β funcionan como heterodímeros con el receptor RXR. LXR/RXR es un "heterodímero permisivo" que puede ser activado tanto por el agonista de LXR como por el ácido 9-cis retinoico, un ligando específico de RXR. El complejo LXR/RXR se une a un elemento de respuesta a LXR (LXRE) en la región promotora de los genes diana, que consta de dos repeticiones directas de nucleótidos hexaméricos, AGGTCA, separados por uno o cuatro nucleótidos (DR1 o DR4) (Hu et al. 2003). Se han identificado numerosos genes diana de LXR, como las isoformas A1, G1, G5 y G8 del transportador tipo "cassete" de unión al ATP (*Abca1*, *Abcg1*, *Abcg5* y *Abcg8*), apolipoproteína E (*ApoE*), la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (*Cetp*), la sintasa de ácidos grasos (*Fas*), la enzima colesterol 7 α -hidroxilasa o citocromo P450 7A1 (*Cyp7a1*) y la proteína de unión al elemento regulador de carbohidratos (*Chrebp*) (Edwards, Kennedy, y Mak 2002). A través de estos genes diana, LXR regula los diferentes procesos biológicos que están implicados en las funciones normales del metabolismo y la inflamación, o en estados patológicos como consecuencia de una pérdida de la función de LXR.

2.8. Mecanismos de acción de los Receptores LXR.

La regulación de la transcripción a través de los LXRs puede explicarse mediante tres mecanismos diferentes de acción: represión independiente del ligando, activación dependiente del ligando y la transrepresión. La represión/activación específica de la actividad de LXR,

es dependiente del tipo celular y del gen diana. En el mecanismo de represión independiente de ligando, el heterodímero LXR/RXR inhibe la transcripción mediante el reclutamiento de los correpresores (NCoR) y (SMRT) en ausencia de ligando (Codina et al. 2005; Hu et al. 2003). En el segundo mecanismo de activación directa dependiente de ligando, la unión del ligando a LXR, inicia la disociación de los correpresores, seguida por el reclutamiento de coactivadores, y comienza la actividad transcripcional de sus genes diana. En el tercer mecanismo de transrepresión, la modificación postraduccional con péptidos SUMO de LXR, inducida por el ligando, le permite unirse a complejos correpresores, evitando su disociación, lo que conlleva a una regulación negativa de forma indirecta de la transcripción de genes diana proinflamatorios como *Cox2*, *Mmp9*, *Il6*, *Mcp1*, *Nos2* e *Il1β*, regulados por los factores de transcripción NF-κB y AP-1 (Ghisletti et al. 2007) (**Figura 10**).

2.9. Función de los receptores LXRs en el metabolismo.

Los receptores LXR, especialmente el receptor LXRα hepático, desempeñan un papel importante en la homeostasis del colesterol, principalmente mediante la regulación de la expresión de proteínas implicadas en procesos relacionados con el transporte reverso del colesterol (RCT), el catabolismo y la excreción del colesterol (Zhang et al. 2012). Estudios realizados en ratones deficientes para LXRα hepático, revelaron que la pérdida de LXRα, afectó la conversión del colesterol en ácidos biliares a través de la enzima (CYP7A1), favoreciendo la excreción de colesterol biliar directamente a través de sus genes diana *Abcg5* y *Abcg8* (Yu et al. 2003). El mantenimiento de los niveles homeostáticos del colesterol, es un proceso mediante el cual el exceso de colesterol en los tejidos periféricos es transferido hasta las lipoproteínas de alta densidad (HDL), para ser transportado hasta el hígado y luego excretado en forma de ácidos biliares. El paso inicial en el RCT es el flujo de salida del

Introducción

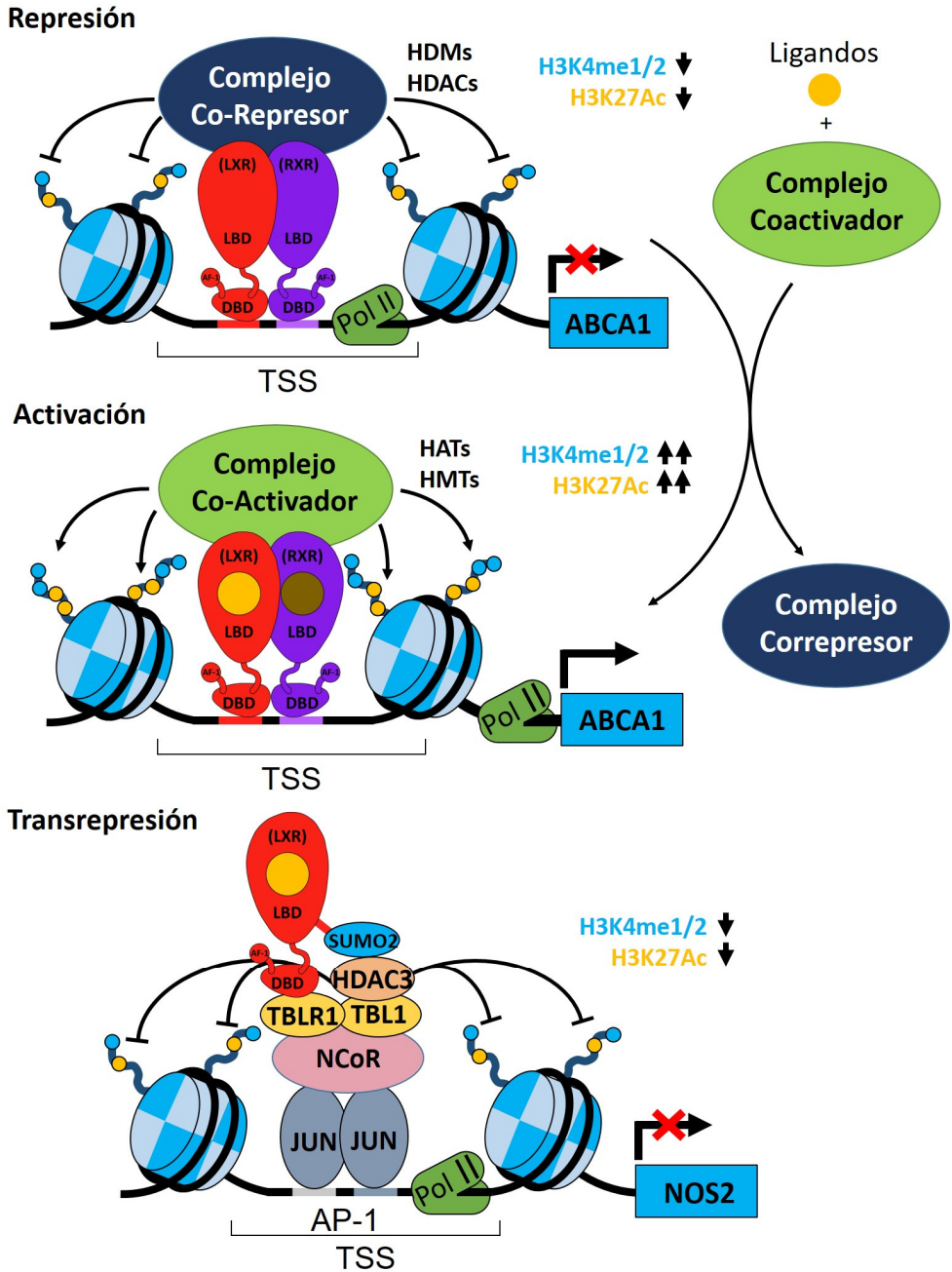


Figura 10. Mecanismos de acción de los receptores LXRs.

colesterol celular, lo que implica la transferencia del colesterol libre a la apolipoproteína A1 (APOA1) o pre-HDL. El flujo de salida del colesterol celular está mediado principalmente por ABCA1 y ABCG1, dos de las primeras proteínas identificadas como genes diana de LXR (Kennedy et al. 2005; Venkateswaran et al. 2000). LXR también regula múltiples aspectos del metabolismo del colesterol intestinal mediante el control de la expresión de varios genes diana. Por ejemplo, la activación de LXR en el intestino promueve la excreción de colesterol fecal mediante la inducción de la expresión de *Abcg5* y *Abcg8* (**Figura 11**).

Las vías de señalización de LXR y de la proteína 2 de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP2), trabajan conjuntamente para mantener los niveles homeostáticos de esteroides celulares y sistémicos. Mientras que LXR facilita la eliminación del exceso de colesterol en respuesta a sus altos niveles celulares, SREBP2 promueve la biosíntesis y la captación del colesterol en respuesta a los bajos niveles presentes en las células. Estudios realizados durante la última década, ha revelado que estas dos vías clave se encuentran interrelacionadas a varios niveles. Mientras que SREBP2 activa la regulación transcripcional de ABCA1 mediante la generación de ligandos de oxisterol de LXR (Wong, Quinn, y Brown 2006), la activación de LXR en el hígado inhibe la biosíntesis del colesterol a través de la inducción por LXR de la secuencia de RNA no codificante (Lexis) (Sallam et al. 2016).

La expresión del receptor de LDL (LDLR), una proteína de la superficie celular, esencial para la captación del colesterol contenido en LDL y en el mantenimiento de los niveles plasmáticos del colesterol (Russell et al. 1984), está regulada a nivel transcripcional por SREBP2. En respuesta a niveles bajos de colesterol, SREBP2 conduce la transcripción de los genes que codifican para las proteínas involucradas en la biosíntesis del colesterol y la captación de colesterol LDL (Hua et al. 1993). LXR induce la

Introducción

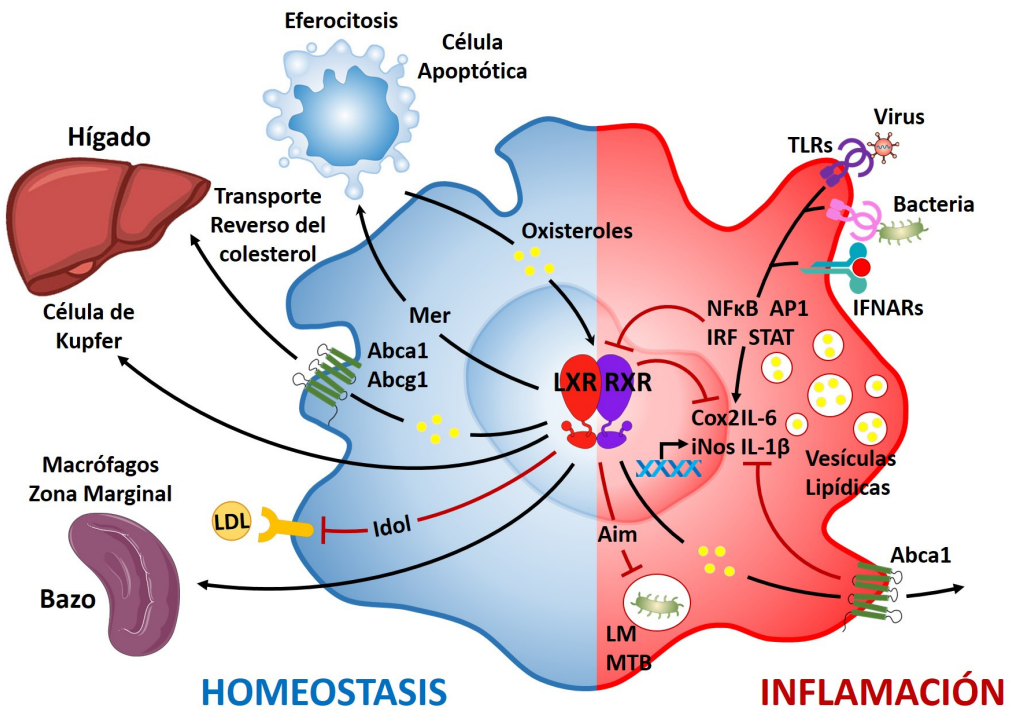


Figura 11. Función de los receptores LXR en el macrófago.

expresión de la proteína inducible de degradación del LDLR (IDOL; también conocido como MYLIP), una proteína ligasa de ubiquitina E3 que degrada el LDLR y las proteínas relacionadas con el receptor VLDL (VLDLR) y el receptor 2 de apolipoproteína E (ApoER2), a través de endocitosis independiente de clatrina, y su degradación lisosomal mediada por los cuerpos multivesiculares (Hong et al. 2010; Scotti et al. 2013; Zelcer et al. 2009) (**Figura 11**).

Además de su importancia en la modulación homeostática del colesterol, LXR también es un regulador clave de la lipogénesis *de novo* en el hígado (Joseph et al. 2002; Repa, Liang, et al. 2000; Schultz et al. 2000). La administración de agonistas de LXR sintéticos a ratones aumenta los niveles hepáticos y plasmáticos de triglicéridos debido a una mayor biosíntesis de ácidos grasos y la secreción de VLDL (Schultz et al. 2000). La actividad lipogénica de LXR se debe, en gran medida, a la inducción transcripcional del gen que codifica para *Srebp1c*, un activador de transcripción central de la biosíntesis de ácidos grasos. Además, los LXR activan directamente la transcripción de varios genes lipogénicos a través de LXRE en sus regiones promotoras, entre los que se incluyen a la sintasa de ácidos grasos (*Fasn*) (Joseph et al. 2002) y la esteroil coenzima A desaturasa 1 (*Scd1*) (Chu et al. 2006). Además, LXR también modula la expresión de otro regulador lipogénico, *Chrebp*. Curiosamente, LXR también es capaz de regular la expresión de *Srebp1c*, a través de otras señales, como los niveles de insulina (G. Chen et al. 2004; Tian, Goldstein, y Brown 2016) y los ácidos grasos poliinsaturados (Yoshikawa et al. 2002).

2.10. Función de los Receptores LXR en la inflamación.

Al igual que otros receptores nucleares, como los GR y los RAR, LXR también desempeña una actividad antiinflamatoria (Zelcer y Tontonoz 2006). Estudios en sistemas de cultivo celular *in vitro*, indican que el tratamiento previo con agonistas de LXR puede atenuar la respuesta

Introducción

inflamatoria inducida por la exposición posterior al tratamiento con LPS. Análisis de expresión génica indican que el tratamiento con agonistas de LXR puede limitar la regulación de la transcripción de genes inflamatorios como *Tnfa*, *Cox2*, *Nos2* y la *Mmp9*, por los factores de transcripción NFκB y AP-1 (Castrillo, Joseph, Marathe, et al. 2003; Ghisletti et al. 2007, 2009; Joseph et al. 2004). Por otro lado, la activación de los receptores TLR3 y TLR4 a través de la infección viral o bacteriana reprime de forma aguda la actividad transcripcional de LXR, lo que conduce a una disminución de la expresión de los genes diana de LXR (Castrillo, Joseph, Vaidya, et al. 2003). La inhibición de LXR dependiente de TLR requiere la actividad de IRF3, un factor de transcripción proinflamatorio adicional. Sin embargo, aún no se han determinado con exactitud, las bases moleculares que conducen a la inhibición de la actividad LXR por IRF3. Curiosamente, estudios de lipidómica han demostrado que las infecciones bacterianas o virales en macrófagos aumentan significativamente los niveles del agonista endógeno de LXR, 25-hidroxicolesterol (Blanc et al. 2013; S.-Y. Liu et al. 2013; Reboldi et al. 2014).

Se han propuesto diversos mecanismos que explican la actividad antiinflamatoria de LXR, por lo que es muy probable que múltiples vías converjan con el fin de limitar la señalización inflamatoria. Ghisletti y colaboradores, demostraron que la expresión génica proinflamatoria era reprimida en ausencia de señales inflamatorias, por los complejos correpresores NCOR1 y SMRT, los mismos correpresores que interactúan con los receptores nucleares (Ghisletti et al. 2009). Las señales proinflamatorias conducen a la liberación de esos correpresores, a través de un mecanismo dependiente de la actina, que requiere la proteína coronina 2A (CORO2A), un componente adicional de los complejos correpresores, que se une al factor de transcripción NFκB y recluta coactivadores, regulando positivamente genes proinflamatorios (W. Huang et al. 2011). El tratamiento con agonistas de LXR provoca modificaciones

postraduccionales del NR, al que se le agregan pequeños péptidos SUMO, similares a la ubiquitina, en un proceso denominado SUMOylación dependiente de ligando, en el cual participan específicamente SUMO2, UBC9 y HDAC4, favoreciendo que LXR SUMOylado sea reclutado hacia los complejos correpresores NCOR1/HDAC3 que se encuentran presentes en los promotores de genes proinflamatorios, a través de su interacción con CORO2A (Ghisletti et al. 2007; W. Huang et al. 2011). La interacción SUMO-LXR/CORO2A impide la liberación de los complejos correpresores dependientes de la señal inflamatoria, conduciendo a una disminución de la expresión de genes proinflamatorios. Dado que no se requiere de la unión directa al ADN para reclutar LXR a los promotores de genes proinflamatorios, este mecanismo se ha denominado “transrepresión”. Por otra parte, este mecanismo de represión de la respuesta inflamatoria dependiente de agonistas de LXR, se pierde en macrófagos derivados de hígado fetal, preparados a partir de ratones deficientes en NCOR1 (Ghisletti et al. 2009).

Sin embargo, otros estudios que han explorado la actividad antiinflamatoria de LXR, no son consistentes con este modelo de transrepresión. Mediante ensayos in vitro, realizados con macrófagos deficientes para las dos isoformas de LXR (LXR α/β -/-), reconstituidos con un LXR que porta mutaciones en los sitios específicos de SUMOylación, se demostró que la modificación de SUMOylación no era necesaria para la actividad antiinflamatoria de LXR (Ito et al. 2015). Por otra parte, los estudios de transrepresión descritos anteriormente sugieren que NCOR1 desempeña un papel crítico en la actividad antiinflamatoria dependiente de LXR (Ghisletti et al. 2009). Sin embargo, Li y colaboradores encontraron que la deficiencia de NCOR1 en macrófagos, disminuye paradójicamente la inflamación (P. Li et al. 2013). Estos macrófagos deficientes en NCOR1 muestran niveles de expresión elevados para varios genes diana de LXR (mecanismo denominado “desrepresión”), entre los que se incluyen *Scd1*,

Introducción

Scd2 y otros genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos. Además, Li y colaboradores sugieren que existe una inducción de genes regulados por LXR, que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga (PUFA), los cuales se conoce que presentan actividad antiinflamatoria, como el ácido palmitoleico, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), que son esenciales para el fenotipo antiinflamatorio observado en ratones deficientes en NCOR1 (P. Li et al. 2013). La observación realizada por Oishi y colaboradores, que indica que el tratamiento de los macrófagos con LPS in vitro inhibe de forma transitoria la síntesis de ácidos grasos (Oishi et al. 2017), apoya aún más la hipótesis de que los ácidos grasos pueden jugar un papel importante en la limitación de la inflamación. Se ha propuesto que el restablecimiento de la síntesis de los ácidos grasos a las 24 horas de la administración del LPS, desempeña un papel crucial en la fase de resolución de la respuesta inflamatoria mediada por SREBP1c de forma independiente de la actividad de LXR (Oishi et al. 2017).

Junto con la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos, LXR también modula la composición de los fosfolípidos de la membrana plasmática, regulando directamente la expresión de *Lpcat3*, una enzima que remodela los fosfolípidos, al intercambiar los ácidos grasos en la posición sn-2 (Hashidate-Yoshida et al. 2015; Rong et al. 2013, 2015). Por lo tanto, la capacidad de LXR para regular de manera coordinada la síntesis de ácidos grasos y *Lpcat3*, conduce a una mayor incorporación de PUFAs en los fosfolípidos. Rong y colaboradores demostraron que LPCAT3 pueden reducir la inflamación al regular la activación de la quinasa inflamatoria de manera indirecta, a través de los cambios que produce en la composición de los lípidos de la membrana plasmática, afectando a la disponibilidad del sustrato para la producción de mediadores inflamatorios (Rong et al. 2013). Mediante un mecanismo muy parecido al de LPCAT3, se ha demostrado que el flujo de salida de colesterol dependiente de

ABCA1 altera la organización de la membrana plasmática, alterando el reclutamiento de los componentes de la señalización TLR, MyD88 y TRAF6, e interrumpiendo la señalización del receptor, y por lo tanto, inhibe la activación de genes diana de NF- κ B (Ito et al. 2015). En otro trabajo similar, se describió que otro correpresor de LXR, denominado NCOA5 reprime la expresión de ABCA1 y el flujo de salida de colesterol a través de la interferencia de la vía de señalización de TLR3 (Gillespie et al. 2015). De hecho, Ito y colaboradores demostraron que la inducción de ABCA1 dependiente de LXR, es necesaria para que los agonistas de LXR disminuyan la inflamación (Ito et al. 2015). Por el contrario, se ha demostrado que la delección genética de *Abca1* en macrófagos aumenta la expresión de genes proinflamatorios (Pradel et al. 2009; Westerterp et al. 2013). Estos estudios establecen una interrelación entre ABCA1 y la señalización inflamatoria, vinculando directamente la capacidad de LXR para promover la homeostasis del colesterol y la regulación de la inflamación.

2.11. Función antimicrobiana de los Receptores LXR.

Diversos estudios sobre el papel de LXR en la resistencia a infecciones virales o bacterianas han demostrado que este NR desempeña un papel muy importante. En ensayos llevados a cabo con infecciones bacterianas generadas por microorganismos como *L. monocytogenes*, *B. anthracis*, *E. coli* y *S. Typhimurium*, se ha demostrado que LXR tiene un papel fundamental en la supervivencia del macrófago, previniendo la apoptosis inducida por las bacterias (Joseph et al. 2004; Villedor et al. 2004) y contribuyendo a la eliminación y resistencia a la infección por *L. monocytogenes*. LXR también se ha relacionado con la respuesta fagocítica del macrófago durante la infección por *S. Typhimurium*. Los agonistas de LXR reducen los niveles intracelulares de NAD⁺ de una manera dependiente de CD38, contrarrestando los cambios inducidos por

Introducción

S. Typhimurium en la morfología del macrófago y la distribución de actina-F en el citoesqueleto (Matalonga et al. 2017). En modelos de ratón, el tratamiento con agonistas de LXR mejora los signos clínicos de la infección por Salmonella de forma dependiente de CD38 (Matalonga et al. 2017). LXR también se encuentra implicado en la resistencia a la infección con M. tuberculosis (Leopold Wager, Arnett, y Schlesinger 2019). Macrófagos infectados con M. tuberculosis incrementan la regulación de LXR α (Bouttier et al. 2016), mientras que su deficiencia disminuye el control sobre el crecimiento bacteriano intracelular (Korf et al. 2009; Mahajan et al. 2012). La acumulación de cuerpos lipídicos en los macrófagos está asociada con respuestas sensibles a la infección con M. tuberculosis. La activación de LXR α en macrófagos THP-1 aumenta la expresión de *Abca1* y *Abcg1*, responsables del flujo de lípidos, lo que resulta en una disminución de la formación de cuerpos lipídicos durante la infección con M. tuberculosis (Bouttier et al. 2016).

El incremento en los niveles de expresión de *Abca1*, controlado por la actividad de LXR se relaciona con la supresión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en ratones humanizados (Mujawar et al. 2006). El pretratamiento de los macrófagos humanos con el agonista de LXR, TO901317 reduce la susceptibilidad de los macrófagos a la infección por VIH, correlacionándose con la reducción de las balsas lipídicas y la regulación positiva de la expresión de *Abca1*. La administración profiláctica y terapéutica del agonista de LXR en ratones aumentó la resistencia a la infección por VIH y redujo la lipidemia (Ramezani et al. 2015). Recientemente, se ha relacionado la señalización de LXR en la protección contra el gammaherpes virus MHV68, en la que el virus incrementa la expresión de LXR α de una manera dependiente de interferón de tipo 1, resultando en un aumento moderado o nulo en la expresión génica de los genes diana clásicos de LXR como *Abca1*, *Fads2*, y *Scd2* (Lange et al. 2018). La expresión génica de de estas dianas en macrófagos aumenta

significativamente en ratones knockout para LXR antes y después de la infección con MHV68, indicando que la deficiencia de LXR conlleva a la modulación de la actividad represora de LXR, aumentando de esta manera la transcripción de genes diana de LXR. Los macrófagos de ratones deficientes en LXR muestran un aumento en la síntesis de ácidos grasos y colesterol, dos vías metabólicas necesarias para la replicación viral, y consecuentemente también mostraron una mayor replicación de MHV68 (Lange et al. 2018).

Aunque LXR parece desempeñar un papel bastante beneficioso contra las infecciones virales y bacterianas, en las infecciones parasitarias ocurre todo lo contrario. Ratones que carecen de señalización de LXR aparentan ser más resistentes a la infección con *Leishmania chagasi* y *Leishmania infantum* (Bruhn et al. 2010). BMDMs de ratones knockout para LXR α estimulados con IFN- γ aumentaron su capacidad de destrucción del parásito en comparación con los BMDMs de ratones WT, produciendo más óxido nítrico (NO) e IL-1 β . Por otra parte, los ligandos de LXR anularon la producción de NO en macrófagos WT en respuesta a la infección.

A pesar de que en estas últimas décadas de investigación en el papel funcional de los receptores LXR, siempre se ha considerado que ambas isoformas desempeñan funciones biológicas muy parecidas, salvo algunas excepciones, y debido a las diferencias existentes en cuanto a los patrones de expresión de ambas isoformas, se desconocen que programas génicos pueden estar regulados de manera específica por cada una de ellas, así como las vías de señalización que regulan la expresión de los receptores LXR. Por otra parte, existen numerosos datos publicados que apuntan a LXR α como mediador en la respuesta inmunitaria frente a las infecciones. Es por ello que en esta Tesis hemos decidido abordar el estudio de todos estos aspectos para tratar de profundizar en el conocimiento de estos receptores nucleares.

OBJETIVOS

Los objetivos propuestos para el desarrollo de la presente tesis se resumen en los siguientes apartados:

1. Caracterizar la distribución de los sitios de ocupación genómica de las isoformas LXR α y LXR β de manera independiente, así como los patrones de marcas epigenómicas relacionadas con la activación transcripcional, desde el punto de vista farmacológico y funcional de LXR, a partir de una línea inmortalizada de macrófago murino derivada de médula ósea, que sobre expresa de manera individual cada una de las isoformas de LXR (iBMDMs-LXR α e iBMDMs-LXR β), mediante el empleo de la técnica de ChIP-PCR y ChIP-seq.
2. Determinar las acciones transcripcionales individuales mediadas por las isoformas de LXR, utilizando una combinación de estrategias farmacológica y de pérdida de función, en el modelo de iBMDMs-LXR α , iBMDMs-LXR β e iBMDMs-DKO, mediante el análisis de los patrones de expresión de genes diana de LXR, con la técnica de qPCR y el análisis de microarrays.
3. Estudiar la expresión transcripcional de los receptores LXRs y sus genes diana, en respuesta a mediadores inflamatorios, mediante qPCR y datos públicos de microarrays.
4. Caracterizar las vías de señalización inflamatorias, implicadas en la regulación de la expresión de los receptores LXRs, mediante el empleo de inhibidores específicos de las diferentes vías de señalización, de ratones knockout y de datos públicos de ChIP-seq.
5. Analizar, en respuesta a la inflamación, la distribución de los sitios de ocupación genómica de la isoforma LXR α , en BMDMs DKO y LXR β -/- mediante el empleo de la técnica de ChIP-seq.

Objetivos

6. Explorar nuevas dianas transcripcionales de los receptores LXRs, en respuesta a mediadores inflamatorios en macrófagos derivados de médula ósea WT, LXR α -/- y LXR β -/-, mediante técnicas de qPCR y de microarray.

7. Determinar el papel de LXR α en la respuesta inmune innata, mediante el empleo de un modelo in vivo de peritonitis inducida por mediadores inflamatorios, en ratones WT y LXR α -/-, por la técnica de citometría de flujo, usando marcadores antigénicos específicos para las diferentes poblaciones de macrófagos peritoneales.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación.

Para la realización de esta tesis, se utilizaron ratones de diferentes genotipos, con edades comprendidas de entre las 8 y 10 semanas. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar y mantenidos en condiciones libres de patógenos en habitaciones con la temperatura controlada, y con ciclos de luz oscuridad de 12 horas, en las instalaciones del Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Todos los estudios realizados con animales de experimentación se realizaron de acuerdo a los protocolos establecidos por el comité de Investigación ética de la ULPGC (protocolo CEEA-ULPGC 2015-002 y resolución 414-2015-ULPGC).

1.1. Ratones Knockout.

Los ratones utilizados para los experimentos presentados en esta tesis pertenecen a la cepa de fondo mixto SV129/C57BL/6 (UTSW), con los siguientes genotipos:

- Wild Type (WT), cepa salvaje
- Knockout LXR α $-/-$, deficientes para el gen *Nr1h3*.
- Knockout LXR β $-/-$, deficientes para el gen *Nr1h2*.
- Double knockout LXR $\alpha\beta$ $-/-$, deficientes para los genes *Nr1h2* y *Nr1h3*.
- Knockout IRF3 $-/-$, deficientes para el gen *Irf3*.
- Knockout TNF $-/-$, deficientes para el gen *Tnfa*.
- Knockout IRF1 $-/-$, deficientes para el gen *Irf1*.

Material y métodos

- Knockout STAT1 *-/-*, deficientes para el gen *Stat1*.
- Knockout IFNAR1 *-/-*, deficientes para el gen *Ifnar1*.
- Knockout MYD88 *-/-*, deficientes para el gen *Myd88*.
- Knockout TRIF *-/-*, deficientes para el gen *Trif*

Los ratones WT, LXR α *-/-*, LXR β *-/-* y LXR $\alpha\beta$ *-/-* fueron cedidos amablemente por el Dr. David Mangelsdorf de la Universidad de Southwestern, Texas. Los ratones IRF3 *-/-* y TNF *-/-* fueron cedidos por el Dr. Genhong Cheng del Instituto de Biología Molecular, UCLA. Los ratones IRF1 *-/-* por el Dr. Lionel Apetoh de la Universidad de Bourgogne, Francia. Los ratones STAT1 *-/-* fueron cedidos por la Dra. Ana Planas del Instituto de Investigaciones Biomédicas “August Pi i Sunyer” (IDIBAPS) de Barcelona. Los ratones INFNAR1 *-/-* y MYD88 *-/-* fueron cedidos por el Dr. Carlos Ardavin del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del CSIC. Los ratones TRIF *-/-* fueron cedidos por Gloria González de la CIMA, Universidad de Navarra.

También fueron empleados ratones con fondo C57BL/6 procedentes del Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France), cedidos por el Dr. D. Kioussis, que presentan un genotipo LXR α *-/-* específico de células hematopoyéticas.

2. Cultivos celulares.

Todos los cultivos celulares se realizaron en un incubador manteniendo las condiciones de temperatura (37°C) y atmosfera (5 % de CO₂ – 95 % de aire) constantes. Los medios de cultivos empleados fueron RPMI 1640 (Lonza) completo (para las células primarias) o DMEM (Lonza) completo (para las líneas celulares inmortales), suplementados con un 10

% de FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific), Penicilina (100U/ml) (Sigma) y Estreptomicina (100 µg/ml) (Sigma).

2.1. Cultivos primarios de macrófagos derivados de médula ósea.

Para obtener macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs), una vez sacrificado el ratón mediante anestesia con isoflurano, se retiran todos los tejidos blandos para obtener el fémur y la tibia intactos de las dos patas traseras del animal. A continuación, en condiciones de esterilidad, se cortan los extremos de ambos huesos (epífisis) y se realiza un lavado del interior del hueso para obtener el tejido de la médula ósea, con tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,4 empleando una jeringuilla de 10 ml y una aguja hipodérmica de 25G (0,5mm x 25mm) (BD Microlance™).

Posteriormente, se disgrega el tejido pipeteando varias veces, se pasa a través de un filtro de nylon de 70µm (BD Falcon™), para eliminar los restos de tejido no deseado (restos de agregados tisulares), y se centrifuga 5 minutos a 1.500 rpm. Una vez obtenido el pellet de células de la médula ósea, se procede a lisar los eritrocitos, resuspendiendo las células en 1 ml de buffer de lisis de células rojas (RBC) estéril (Sigma). Esta solución se deja actuar durante 2 minutos a temperatura ambiente para favorecer la lisis de los eritrocitos. A continuación, se diluye con PBS en una relación 1:10, y se vuelve a pasar todo el volumen por un filtro de nylon de 70µm para eliminar los restos de agregados celulares, y se vuelve a centrifugar 5 minutos a 1.500 rpm.

El pellet de células obtenido se resuspende en medio de cultivo de diferenciación, RPMI 1640 (Lonza) completo, suplementado con un 10% del sobrenadante concentrado proveniente de células (Hibridoma) L929, productoras de la citoquina (M-CSF). Las células se siembran en 8 placas de tipo Petri no adherentes (VWR), con 8 ml de medio. Los cultivos de

Material y métodos

células se mantuvieron en estas condiciones durante 7 días, y transcurrido ese tiempo, se realizaron los experimentos en esas mismas placas de cultivo, con medio fresco de diferenciación conteniendo los diferentes tratamientos.

2.2. Cultivos de macrófagos peritoneales.

Los macrófagos diferenciados de la cavidad peritoneal de los ratones, se obtuvieron mediante inyección intraperitoneal de 3 ml de medio estéril de tioglicolato al 3% y pH7,0 (BD Difco), preparado al menos un mes antes de su uso. Después de 3 días de peritonitis aséptica, se recogieron los macrófagos realizando tres lavados de la cavidad peritoneal con 10 ml de PBS frío y estéril, utilizando una jeringa de 10 ml y una aguja de 23G (0,6mm x 25mm) (BD Microlance TM3). La suspensión de células se pasó a través de un filtro de nylon de 70µm (BD FalconTM), para eliminar restos de tejidos no deseados, y se centrifugó 5 minutos a 1.500 rpm. El pellet de células que se obtiene, se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Lonza) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Gibco), penicilina (100 U/ml) (Sigma) y estreptomycin (100 µ/ml) (Sigma).

Para el cultivo, las células fueron contadas en una cámara de Neubauer improved (Marienfeld), discriminando por tamaño entre las diferentes células obtenidas en el lavado, para posteriormente ser sembradas en placas tratadas para el cultivo celular en una densidad aproximada a los $2,5 \times 10^6$ de macrófagos por pocillo, en placas multiwell de 6 pocillos (Falcon) o 4×10^6 de macrófagos por pocillo en dishes de 60 mm (Falcon). Al cabo de unas horas se realizan 3 lavados al cultivo con PBS estéril para retirar las células no adheridas y se cultivan en medio completo fresco durante al menos 8-12 horas previas a la realización de los correspondientes tratamientos.

2.3. Líneas celulares inmortales (iBMDMs).

Para algunos de los objetivos marcados en esta tesis, se emplearon dos líneas celulares de macrófagos inmortales LXR α / β $-/-$, derivadas de BMDMs (iBMDMs), reconstituidas con vectores de expresión independientes, que contienen una copia del receptor LXR α o LXR β humano, bajo el control de un promotor viral. Los extremos amino terminales de ambas proteínas fueron modificados, para que incluyeran tres copias del polipéptido 3xFLAG. Estas líneas fueron creadas en nuestro laboratorio por Ana Ramón Vázquez. Las células iBMDMs fueron cultivadas en DMEM (Lonza) completo en placas tratadas para cultivo celular, a una densidad aproximada a los 10×10^6 macrófagos por placa de 100 mm (Falcon).

3. Tratamientos farmacológicos in vitro.

Los diferentes tratamientos farmacológicos in vitro, se realizaron en cultivos de células primarias (BMDMs o macrófagos peritoneales), o en las líneas celulares iBMDMs (3Flag-LXR α o 3Flag-LXR β) como se describe a continuación:

Para el estudio de la función de LXR, se usaron ligandos farmacológicos sintéticos como: el agonista GW3965 (GSK) a una concentración final de 2 μ M, el antagonista GSK1440233A (GW233) (Zuercher et al. 2010) a una concentración final de 2 μ M, todos ellos preparados a partir de una solución stock en DMSO (Sigma). La preparación del antagonista de LXR requiere una dilución intermedia 1:10 con PBS o medio de cultivo, debido a su baja solubilidad en medios acuosos.

Para determinados experimentos de ChIP-seq y Microarray, se utilizó el antagonista de LXR (GW233) en unas condiciones de serodepresión

Material y métodos

específicas, para las cuales se utilizó un medio bajo en ácidos grasos, consistente en medio de cultivo DMEM sin suero, suplementado con 0,2% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma), 1% de la mezcla de antibióticos y ácido zaragóxico a 2 μ M (Sigma), durante al menos 4 horas antes de la adición del tratamiento con los ligandos sintéticos. El ácido zaragóxico es un compuesto de origen fúngico, que inhibe la actividad de la enzima escualeno sintetasa, la cual cataliza la síntesis de escualeno, que es un precursor de la vía de la síntesis del colesterol, de esta manera, se intentó reducir el máximo posible la contribución de los ligandos naturales endógenos.

Para caracterizar las vías de señalización TLR3/4 implicadas en la regulación de la expresión de los receptores LXR, cultivos celulares primarios de BMDMs fueron tratados en RPMI completo, con los siguientes Inhibidores farmacológicos: El BI605906 (inhibidor selectivo de IKK β , una quinasa implicada en la vía de señalización de NF- κ B (Clark et al. 2011)), a una concentración final de 1 μ M; el 5Z-7-oxozeanol (inhibidor selectivo de TAK1, una quinasa implicada en la vía de señalización de NF- κ B (Ninomiya-Tsuji et al. 2003)), a 1 μ M; el PD0325901 (inhibidor selectivo de MEK/ERK, quinasas de la vía de señalización de las MAPKK (Long et al. 2017)), a 10 μ M; el PD98059 (inhibidor selectivo de MEK1 y MEK2, quinasas implicadas en la vía de señalización de las MAPKK (Jeon et al. 2001)) a 10 μ M; PIK-75-hidrochloride (inhibidor específico de la subunidad p110 α de PI3K, una quinasa implicada en la vía de señalización que promueve la supervivencia y el crecimiento (Knight et al. 2006)) a 2 μ M; el SB590885 (inhibidor selectivo de RAF-1, una quinasa de la vía de señalización de las MAPKK (Qiao y May 2009)) a 1 μ M; el HX531 (inhibidor selectivo de RXR (Natrajan et al. 2015)) a 2 μ M y MRT67307 (inhibidor selectivo de TBK1, una quinasa de la vía de señalización TLR3, que activa a IRF3 (Clark et al. 2011)), a una concentración final de 2 μ M.

Para el estudio del papel de LXR en la respuesta inflamatoria se utilizaron agonistas de las vías de señalización TLR3 (Poly I:C) y TLR4/TLR3 (LPS) a concentraciones finales de 10 µg/ml y 100 ng/ml respectivamente.

Para el estudio de la vida media de los receptores LXRs, se utilizó el inhibidor de la síntesis de proteínas, cicloheximida (que interfiere en la actividad peptidil transferasa de la subunidad 60S del ribosoma (Ignatova et al. 2013)), a una concentración final de 5 µM.

4. Tratamientos farmacológicos in vivo.

Para los estudios in vivo, varios grupos de entre 3 – 4 ratones WT o LXRα -/- fueron tratados vía intraperitoneal con una solución de LPS a 4 mg/Kg, del medio de cultivo Tioglicolato (2 ml en solución al 3%), o con una solución de Zymosan (un glucano componente de la pared de hongos y levaduras) a 40 mg/Kg. Transcurridas 24 horas del tratamiento con LPS, se sacrificaron los animales mediante anestesia con isoflurano y se recogieron las células de la cavidad peritoneal, mediante lavados con PBS.

5. Anticuerpos.

Los anticuerpos que se utilizaron en las diferentes técnicas empleadas, se resumen en la (**Tabla 1**).

6. Análisis de proteínas por Western Blot.

Los niveles de expresión de proteína fueron determinados mediante la técnica de Western Blot (WB). Para ello, las células fueron cultivadas en dishes de 60 mm (aprox. 4×10^6) y estimuladas con algunos de los tratamientos indicados en el apartado anterior. Una vez transcurrido el tiempo de estimulación, se retiró lo máximo posible el medio de cultivo, y las células fueron congeladas a -80 °C, para favorecer la extracción de las

Material y métodos

Anticuerpo	Casa comercial	WB	ChIP	Citom.
Mouse Anti-FLAG	Sigma (clon F3165)	1:1000	4 µg	-
Rabbit Anti-LXRα/β	Dr. Knut R. Steffensen	1:1000	4 µg	-
Mouse Anti-LXRα	Abcam (clon PPZ0412)	1:1000	-	-
Rabbit Anti-H3K27Ac	Abcam (ab4729)	-	4 µg	-
Rabbit Anti-NOS2	SC-650 (M-19)	1:1000	-	-
Rabbit Anti-ABCA1	Novus NB400-105	1:5000	-	-
Rabbit GAPDH	Abcam AB9485-100	1:1000	-	-
Rabbit Anti-mouse HRP	SC-2005	1:10000	-	-
Rabbit Anti-rabbit HRP	SC-2004	1:10000	-	-
Rat Anti-CD11b-PerCP-Cy5.5	Biolegend (clon M1/70)	-	-	2 ug/ml
Rat Anti-F4/80-PE o FITC	Immunostep (clon BM8)	-	-	2 ug/ml
Rat Anti-Ly6G-PE o FITC	BD Pharmingen (clon AL21)	-	-	2 ug/ml

Tabla 1. Listado de anticuerpos.

Material y métodos

proteínas, que posteriormente fueron solubilizadas en 75 µl de tampón de lisis de radioinmunoensayo (RIPA) (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tritón X100 1%, deoxicolato sódico 0,5% y SDS 0,1%), suplementado con un inhibidor de proteasas Complete (Roche). Transcurridos 10 minutos de incubación en hielo, los extractos fueron centrifugados a 14.500 rpm, y los sobrenadantes se transfirieron a tubos eppendorf nuevos. A continuación, los extractos de proteínas se cuantificaron por el método del ácido bicinonínico (BCA) (Sigma), en un lector de placas Microplate Reader Model 680 (Bio-Rad). Se cargaron aproximadamente entre 50 – 120 µg de proteínas totales, en tampón de carga (SDS 10%, Tris-HCl 0,25 M pH6,8; azul de bromofenol 0,1%, glicerol 50%, 2-mercaptoetanol 5%), y se separaron por tamaños en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 7,5%-10% (Acrilamida:Bisacrilamida 29:1, Bio-Rad), aplicando un campo eléctrico de 120V, en tampón de electroforesis (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y 0,1% de SDS).

A continuación, Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de PVDF (TB Diagnost) (previamente activadas durante 2 minutos con metanol 100%), aplicando un campo eléctrico de 400mA durante 90 minutos a 4°C en tampón de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, 0,1% de SDS y 20% metanol). Después de la transferencia, las membranas se lavaron en buffer TBS-T (Tris-base 20mM, NaCl 150 mM y 0,5% Tween 20, pH 7,5), para eliminar el exceso de metanol, y posteriormente fueron bloqueadas (para sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos de revelado), incubando la membrana durante 60 minutos con Blotto (Santa Cruz Biotechnology) al 5% en TBS-T. Después de la incubación con la solución de bloqueo, las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios diluidos en Blotto al 2,5% en TBS-T, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 5 minutos y seguidamente se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa de

Material y métodos

rábano (HRP) en Blotto al 2,5% en TBS-T, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas fueron visualizadas con el sustrato quimioluminiscente de la HRP, kit Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad) y el sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

Los anticuerpos empleados para la visualización de los WB se enumeran en la (**Tabla 1**):

7. Análisis de expresión de mRNA.

Para analizar los niveles de expresión de mRNA, las células fueron cultivadas en Multiwell de 6 pocillos (Falcon) (iBMDMs) ($2,5 \times 10^6$ células por pocillo), o en dishes de Petri de 60 mm (BMDMs) (4×10^6 células por pocillo) con algunos de los tratamientos indicados en el apartado anterior. Una vez transcurrido el periodo de tratamiento, el RNA total se extrajo utilizando 1 ml del reactivo comercial TRI-Reagent® (MRC) por muestra. Para la purificación del mRNA, se añadió cloroformo en una proporción 1:5 respecto al volumen del TRI-Reagent®, se agitó durante 10 segundos y se centrifugó a 14.500 rpm durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se añadió isopropanol frío en una proporción 1:1. La precipitación del mRNA se realizó a temperatura ambiente, incubando durante 20 minutos y a continuación se centrifugó a 14.500 rpm durante 15 minutos a 4°C. El mRNA precipitado se lavó dos veces con etanol frío al 75% en agua estéril con DEPC (Sigma) y se resuspendió en agua estéril con DEPC (15 – 30 μ l dependiendo del tamaño del pelet obtenido). La concentración del mRNA se determinó con un espectrofotómetro Nanodrop®. Antes de la retrotranscripción del mRNA (RT-PCR) a DNA complementario (cDNA), las muestras fueron diluidas hasta obtener una concentración de 0,5 μ g/ μ l.

7.1. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).

Para la síntesis del cDNA, se usó 1 µg total del mRNA de cada muestra, con el kit de síntesis iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad) en un volumen final de 20 µl siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de retrotranscripción fueron: 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C, empleándose para ello un termociclador (Bio-Rad) y tubos con tapas ópticas (Bio-Rad). Al terminar la síntesis, cada tubo de reacción se diluyó 1:10 añadiendo 180 µl de agua estéril DEPC.

Para el análisis de la expresión génica se emplearon 5 µl de la dilución 1:10 de cDNA de cada muestra, que se mezclaron con 15 µl del kit 2x PCR Master Mix (Diagenode), que incluye la enzima Taq polimerasa en un tampón con MgCl₂ y nucleótidos, isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el cóctel de cebadores específicos (pMix) a 0,4 µM (que amplifican regiones de 50 – 100 pares de bases, de los genes diana de interés). Cada muestra se analizó por triplicado en una placa de 96 pocillos (Bio-Rad), sellada con película adhesiva (Bio-Rad) o en tubos con tapa óptica (Bio-Rad) compatibles con el termociclador.

La fluorescencia fue leída en un termociclador CFX connect™ (Bio-Rad) y procesada por el software CFX Manager™ 3.0. La expresión génica de todos los genes fue analizada mediante el método denominado $\Delta\Delta C_t$ (delta delta Ct), mediante la cual, la expresión de cada muestra es normalizada a la expresión endógena de un gen elegido como referencia (36B4) y relativizada a los niveles de expresión de la muestra de control experimental.

Las condiciones de los ciclos de amplificación del cDNA y los cebadores utilizados en la amplificación se muestran a continuación en la **Figura 1** y la **Tabla 2** respectivamente:

Material y métodos

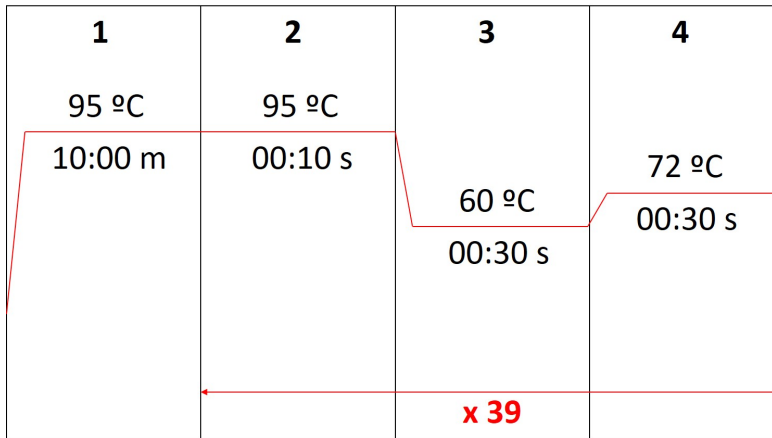


Figura 1. Condiciones de los ciclos de amplificación por qPCR.

Gen	Orientación	Secuencia
Abca1	Sentido	5'- GCA GAT CAA GCA TCC CAA CT-3'
	Anti-sentido	5'- CCA GAG AAT GTT TCA TTG TCC A-3'
Nos2	Sentido	5'- GCA GCT GGG CTG TAC AAA -3'
	Anti-sentido	5'- AGC GTT TCG GGA TCT GAA T -3'
Nr1h3	Sentido	5'- CAA CAG TGT AAC AGG CGC T-3'
	Anti-sentido	5'- TGC AAT GGG CCA AGG C-3'
Nr1h2	Sentido	5'- CCC CAC AAG TTC TCT GGA CAC T-3'
	Anti-sentido	5'- TGA CGT GGC GGA GGT ACT G-3'
36b4	Sentido	5'- GGC CCT GCA CTC TCG CTT TC -3'
	Anti-sentido	5'- TGC CAG GAC GCG CTT GT -3'
Fads1	Sentido	5'- TCA GCG ACT TCA GCC -3'
	Anti-sentido	5'- AAA AGG ATC CGT GGC AT -3'
Fads2	Sentido	5'- AAG GGA GGT AAC CAG GGA GAG -3'
	Anti-sentido	5'- CCG CTG GGA CCA TTT GGT AA -3'
Scd1	Sentido	5'- TCA GCA CTG GGA AAG TGA GG -3'
	Anti-sentido	5'- AAC TGG AGA TCT CTT GGA GCA T -3'
Scd2	Sentido	5'- CTG GAA ATG CAA AGA CCG GA -3'
	Anti-sentido	5'- AGA CGC GGA GAG GTA CAT AA -3'
Il1β	Sentido	5'-TGT AAT GAA AGA CGG CAC ACC-3'
	Anti-sentido	5'-TCT TCT TTG GGT ATT GCT TGG-3'
Ccl2	Sentido	5'- CAT CCA CGT GTT GGC TCA-3'
	Anti-sentido	5'- GAT CAT CTT GCT GGT GAA TGA GT-3'
Inhba	Sentido	5' - ATC ATC ACC TTT GCC GAG TC - 3'
	Anti-sentido	5' - TCA CTG CCT TCC TTG GAA AT - 3'
Cd5l	Sentido	5'- TTT GTT GGA TCG TGT TTT TCA GA -3'
	Anti-sentido	5'- CTT CAC AGC GGT GGG CA -3'

Tabla 2. Listado de cebadores para qPCR.

7.2. Expresión de mRNA por Microarray.

Para el estudio de expresión genómica global se utilizó la técnica de microarrays, para la que se purificó una segunda vez el mRNA después de su extracción, utilizando un kit de columnas RNeasy MinElute CleanUP kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. De esta manera se eliminaron aquellas impurezas que se pudieron arrastrar durante el proceso de extracción.

En el caso de las muestras de iBMDMs, se realizaron 3 experimentos independientes para la obtención del mRNA, siguiendo la metodología descrita. Tras la comprobación de la idoneidad y reproducibilidad de cada uno de ellos mediante PCR a tiempo real (qPCR), se combinaron empleando volúmenes iguales de cada uno y se procesaron mediante esta técnica. Por otra parte, para las muestras de BMDMs, se realizaron 2 experimentos independientes que se utilizaron como replicados biológicos para su análisis en la plataforma de Affymetrix.

El microarray fue realizado en el Parque Científico de Madrid - UCM. El modelo de chip empleado fue el Mouse Gene 2.0 ST de Affymetrix. Para la obtención de los valores de expresión, se utilizaron diferentes programas de Affymetrix. El software Expression Console (EC), se empleó para la normalización de los datos y la obtención de los niveles de expresión en base 2 logarítmica, y el software Transcriptome Analysis Console (TAC), se utilizó para la comparación de los niveles de expresión entre las diferentes muestras y la obtención de los metadatos relativos a aquellos genes expresados de manera diferencial. Sólo se consideraron aquellos cambios en los niveles de expresión génica, cuya magnitud fue igual o mayor a dos veces los niveles de expresión de las condiciones de referencia, y en aquellos casos en los que fueron realizados replicados biológicos, aquellos que además presentaran un p-valor menor de 0,05.

Material y métodos

Las representaciones de Diagramas de Venn se realizaron usando el paquete de Bioconductor VennDiagram (H. Chen y Boutros 2011), un paquete en lenguaje R (versión 2.14.1, en interfaz RStudio versión 0.97.173). La representación de mapas de calor (heatmaps), se realizó utilizando la herramienta Heatmapper Expression tool (Babicki et al. 2016). Para el análisis de enriquecimiento funcional u Ontología Génica (GO), mediante el cual se pueden conocer que procesos, funciones o localizaciones son enriquecidas, basándose en grupos de genes expresados diferencialmente, se empleó la herramienta web Metascape (Yingyao Zhou et al. 2019).

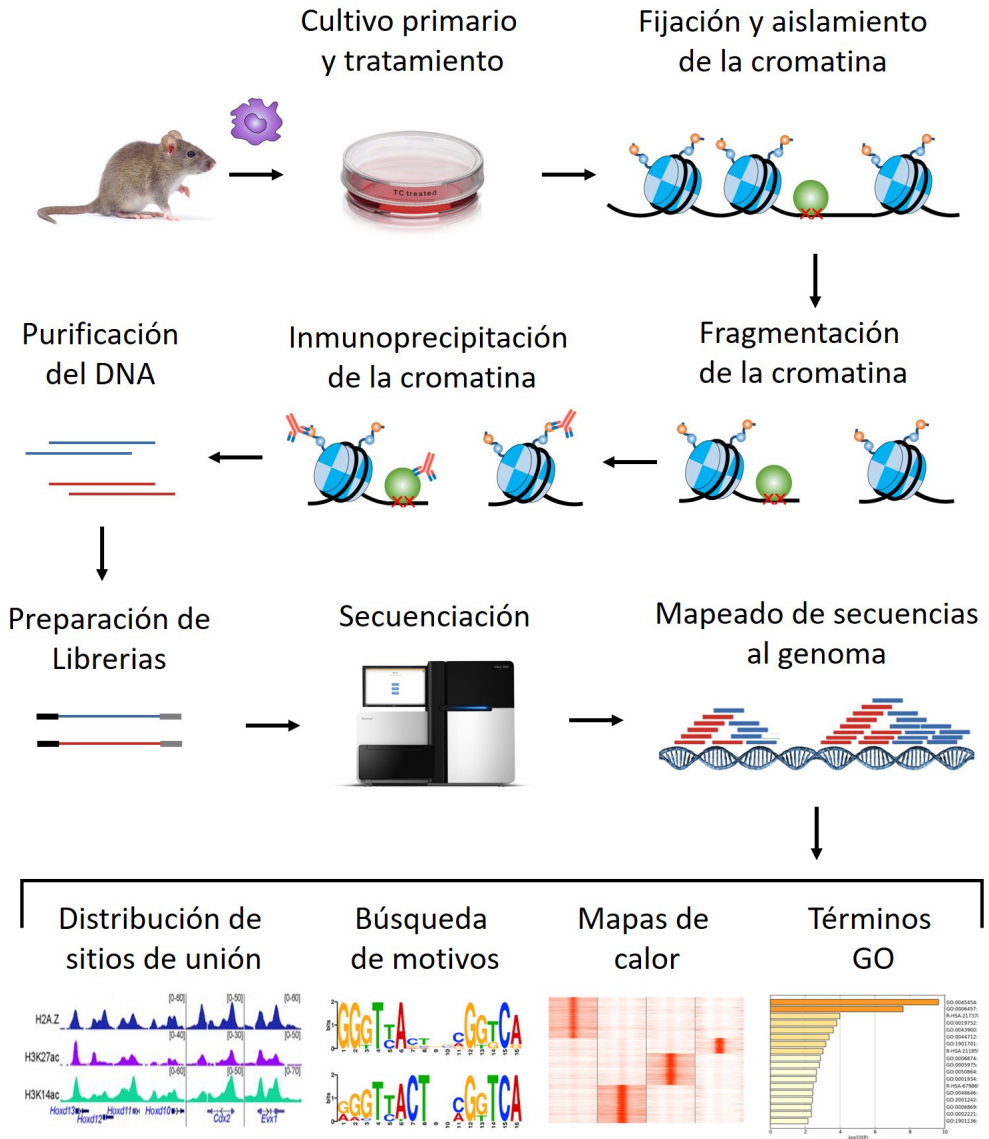
También fueron analizados datos de Microarray, obtenidos a partir de la base de datos pública (Array Express), con el número de acceso (E-TABM-310) (Ramsey et al. 2008).

8. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Para el estudio de los sitios de ocupación de LXR en regiones reguladoras del genoma, se empleó la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) acoplada a la qPCR (ChIP-PCR) o secuenciación masiva de alto rendimiento (ChIP-seq) (**Figura 2**). Para este tipo de ensayos se emplearon las iBMDMs 3Flag-LXR α o 3Flag-LXR β , y los cultivos primarios de BMDMs, utilizando diferentes estrategias en cada caso.

Para el estudio diferencial de los sitios de ocupación genómicos de LXR α y LXR β , se utilizaron cultivos de iBMDMs que fueron tratadas en condiciones de serodepresión (DMEM 0,5% de FBS) con GW3965 (2 μ M) durante 16h. Por otra parte, para el estudio de las de marcas epigenéticas de acetilación de histonas (H3K27Ac), cultivos de iBMDMs fueron tratados en condiciones de serodepresión (DMEM 0,2% de BSA y ácido zaragóxico 2 μ M) con GW3865 (2 μ M) (para obtener una máxima activación) o con GSK2033 (2 μ M) (para obtener una máxima represión) durante 16h.

Material y métodos



Análisis Bioinformático

Figura 2. Esquema de las distintas etapas de la técnica de ChIP-seq.

Material y métodos

Por otra parte, para el estudio de los sitios de ocupación genómica de LXR α en la respuesta inflamatoria inducida por el LPS, se utilizaron cultivos primarios de BMDMs DKO y LXR β -/- en medio de diferenciación completo fresco, tratados durante 24 horas con PBS (controles) o con LPS (100 ng/ml).

8.1. Fijación, purificación y sonicado de la cromatina.

En el desarrollo del ChIP, primero se someten a las células a una doble fijación. En un primer paso, las células se levantan del plato de cultivo en el mismo medio en el que fueron tratadas y se cuentan. A continuación, se centrifugan a 1500 rpms. y se elimina lo máximo posible el medio de cultivo, para resuspender en PBS con DSG (di-N-succinimidil glutarato) (Thermo Fisher Scientific) a una concentración final de 2 mM. Se distribuyen 2×10^7 células por cada mililitro en tubos Eppendorf de 1,5mL, durante 30 minutos a temperatura ambiente en rotación suave. El DSG es un compuesto fijador que reacciona con las aminas peptídicas a través de dos ésteres N-hidroxisuccinimida (NHS) situados en polos opuestos de la molécula. Debido a que el tamaño del brazo espaciador entre los dos ésteres NHS es lo suficientemente largo, permite crear redes de fijación muy extensas y por tanto también permite fijar aquellas proteínas que se encuentran formando complejos de proteínas, ancladas de manera indirecta al DNA, a través de factores de transcripción, como ocurre en el caso de las proteínas coreguladoras de la transcripción (Nowak, Tian, y Brasier 2005).

Una vez que ha transcurrido el periodo de fijación con el DSG, las células se lavan con PBS dos veces a temperatura ambiente. A continuación, se vuelven a fijar con formaldehído al 1% en PBS durante 10 minutos. Este compuesto a diferencia del DSG, debido a que presenta unos brazos espaciadores relativamente cortos, solo permitirá fijar aquellas proteínas que se encuentran directamente ancladas al DNA. La reacción

se detiene añadiendo glicina a cada tubo (concentración final de 200 mM) (Sigma).

Una vez finalizada la segunda fijación, las células se lavan dos veces con PBS frío, para eliminar los restos de formaldehído. En este punto, se puede congelar el pellet de células a -80 °C, para favorecer el proceso de lisis. La lisis de las células se lleva a cabo también en dos etapas; en la primera se emplea una solución hipotónica (Tris-HCl 50mM pH8, KCl 85mM, NP-40 0,5%) suplementada con inhibidor de proteasas Complete (Roche) durante 10 minutos a 4°C, que libera los núcleos celulares intactos. A continuación, se centrifugan los tubos a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, con el fin de separar los núcleos celulares del material citoplasmático. Se descarta el sobrenadante y el material nuclear se resuspende (300 µl por cada 1×10^7 células) en una solución de lisis (Tris-HCl 50mM pH8, EDTA 10mM, SDS 1%) con inhibidor de proteasas, dejándose durante 10 minutos a 4°C.

La cromatina que se obtiene del paso anterior, 300 µl por tubo, se sonica usando un sonicador Bioruptor (Diagenode) en un baño de agua/hielo a la máxima potencia durante 9 - 12 ciclos de 5 minutos (30 segundos apagado/ 30 segundos encendido). Después de la sonicación, las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 14.500 rpm antes de recoger el sobrenadante con la cromatina fragmentada. Para comprobar la eficiencia de la sonicación se tomó un 10% del volumen de sobrenadante de cada tubo (lo que se conoce como input o material de partida para la inmunoprecipitación) y se trató con ribonucleasa-A (6 µg/ml) durante 30 minutos a 37°C, posteriormente con proteinasa K (400 µg/ml) (Takara), durante 1 hora a 55°C y finalmente se revirtió en una solución de reversión (SDS 1%, NaHCO₃ 0,1M) durante toda la noche. La cromatina revertida se purificó por el método de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (Sigma), y posteriormente se midió su concentración en un

Material y métodos

espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, Nanodrop Technologies). Para comprobar el tamaño de los fragmentos, se cargan aproximadamente (0,6 - 1,5) μg de cromatina en un gel de agarosa al 1,5 - 2% con TAE (Tris-base, ácido acético glacial y EDTA) junto con un marcador de pesos moleculares de ADN de 100 a 1.000 pares de bases (Bio-Rad, EZ Load 100 bp Molecular Ruler), y se separan los fragmentos aplicando un campo eléctrico 80V durante 30 - 45 minutos. En condiciones óptimas de sonicación, los fragmentos de cromatina deberían de visualizarse en el gel de agarosa entre los 200 – 500 pares de bases.

8.2. Inmunoprecipitación de la cromatina.

A partir de la cuantificación del 10% de la cromatina separada, se calcula la concentración del 90% de la cromatina restante, de tal manera que se igualen las cantidades entre los distintos tratamientos. Para la inmunoprecipitación, se emplearon entre 50 – 100 μg de cromatina sonicada, diluidos con solución de dilución (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 2mM, Triton™ X-100 1%, NaCl 150mM, glicerol 5%) hasta 2 ml, antes de añadirse el anticuerpo (4 μg por tubo de inmunoprecipitación). Para la captura de los complejos proteína/cromatina, se dejó incubando el anticuerpo con los fragmentos de cromatina fijados, durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se comienza la captura de los complejos de anticuerpo/proteína de interés, unido a los fragmentos de cromatina. Para ello, se usaron 100 μl de bolas magnéticas Dynabeads con proteína G (Thermo Fisher Scientific) a cada uno de los tubos de inmunoprecipitación, previamente lavadas con el mismo buffer de dilución, y se incubaron durante 3 - 4 horas en rotación suave a 4°C. A continuación, las bolas magnéticas unidas a los complejos de anticuerpo/proteína/fragmentos de cromatina se lavaron de manera continuada una vez con tres soluciones que contienen concentraciones crecientes de sales (solución I: Tris-HCl

20mM pH8, NaCl 150mM, EDTA 2mM pH8, Triton™ X-100 1%, SDS 0,1%; solución II: Tris-HCl 20mM pH8, NaCl 500mM, EDTA 2mM pH8, Triton™ X-100 1%, SDS 0,1%; solución III: Tris-HCl 10mM pH8, deoxicolato sódico 1%, EDTA 1mM pH8, NP-40 1%, LiCl 250mM) y finalmente se realizaron dos lavados con una solución TE (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM pH8). Para realizar cada lavado las bolas magnéticas fueron inmovilizadas con la ayuda de un soporte magnético. Después del último lavado, las bolas magnéticas unidas a los complejos se trataron y resuspendieron en 100 µl de solución de reversión e incubaron durante toda la noche, tal y como se describió en el apartado anterior. Una vez revertida la cromatina, esta se purificó empleando el kit de purificación QIAquick PCR Purification (Qiagen) y se eluyó en 50 µl del tampón de elución caliente incluido en el kit.

Los anticuerpos empleados en los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se muestran en la (**Tabla 1**):

8.3. ChIP-qPCR.

Para la validación de la técnica de ChIP, realizamos una PCR cuantitativa (qPCR) a partir de una dilución 1:10 de la cromatina purificada y el input. El diseño de los cebadores se realizó en regiones genómicas específicas que habían sido descritas previamente (Sven Heinz et al. 2010; Ostuni et al. 2013). Dicha información fue obtenida a partir de los datos publicados en la base de datos GEO (Gene Expression Omnibus). Los resultados de ChIP-qPCR se representan como el valor normalizado del porcentaje de enriquecimiento sobre el input, con respecto a una región genómica utilizada como control negativo para la unión de los receptores LXR. Los cebadores empleados en la amplificación por qPCR de los fragmentos de ChIP se muestran en la (**Tabla 3**):

Material y métodos

Gen	Orientación	Secuencia
<i>Región Distal</i>	Sentido	5'- GCC TAT CAT GCA TTG TTG GAG T -3'
	Anti-sentido	5'- ACT CAA CTG GCA GAA AAT GGA C -3'
<i>Myliip</i>	Sentido	5'- TCA TCT AAC GCC CGC TAG TAA -3'
	Anti-sentido	5'- ACA CTG TAA TCT GAC ACT TAG GC -3'
<i>Scd1</i>	Sentido	5'- CGG GTG CTG ACC GAG AAT AA -3'
	Anti-sentido	5'- GTT GAA CCC TCA GCC CCAC -3'
<i>Scd2</i>	Sentido	5'- CAG ACG CCT AGA GAG ACC TG -3'
	Anti-sentido	5'- ATT GGC TGC GAG GAG TCA G -3'
<i>Sreb1</i>	Sentido	5'- GAA CCA GCG GTG GGA ACA CAG AGC -3'
	Anti-sentido	5'- GAC GGC GGC AGC TCG GGT TTC TC -3'

Tabla 3. Listado de primers para ChIP-qPCR

8.4. ChIP-seq.

Para la secuenciación de los fragmentos de cromatina enriquecidos para los sitios de unión a las proteínas LXR en el genoma murino, se realizaron al menos 5 - 10 experimentos independientes de ChIP sobre las líneas inmortalizadas iBMDMs, con el anticuerpo específico FLAG, o con el anticuerpo específico para regiones nucleosómicas modificadas con la marca de acetilación H3K27Ac, que fueron reunificados para poder obtener un mínimo de 10 ng totales de cromatina para cada experimento, necesarios para la preparación de las librerías de secuenciación.

Todas las muestras fueron procesadas en el servicio de genómica del Centro de Regulación Genómica de Barcelona, mediante el empleo de NEBNext Ultra DNA Library Prep kit para Illumina (Ref#7370), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la preparación final de las librerías, las muestras fueron amplificadas mediante 12 ciclos de PCR. La secuenciación de las muestras se llevó a cabo usando un equipo Illumina HiSeq2000, a partir del cual se secuenciaron 50 b.p. en el modo de terminación única.

8.5. Análisis Bioinformático de los datos de ChIP-seq.

Los datos de secuenciación obtenidos a partir del equipo Illumina HiSeq2000, en formato fastq (archivos de texto plano que contienen información de las secuencias genómicas, y de la calidad de secuenciación para cada nucleótido), fueron procesados en distintas etapas. En un primer paso fueron verificados para comprobar la calidad de los resultados obtenidos, mediante el empleo del software FastQC (v0.11.06) (Babraham Bioinformatics) (**Figura 3**). Una vez comprobado que la calidad de los datos era óptima, los archivos de secuenciación fueron alineados a la construcción del genoma de referencia de ratón GRCm38 (mm10), utilizando el software bioinformático, bowtie2 (v2.3.4.1) (Langmead y

Material y métodos

Salzberg 2012), que permite alinear los datos de secuenciación obtenidos al genoma de referencia de ratón (mm10). A continuación, se utilizó el software HOMER (v4.9) (Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment), que consiste en una colección de herramientas bioinformáticas para el análisis de datos de secuenciación de nueva generación y la búsqueda de motivos (Sven Heinz et al. 2010). En un primer paso, se crearon los directorios de las lecturas de secuenciación alineadas, a partir de los cuales se normalizaron los datos a 10^7 lecturas únicas mapeadas. Posteriormente, a partir de los datos normalizados se generaron archivos en formato bedgraph o bigwig, para la visualización gráfica de los datos genómicos en visores específicos para este tipo de datos, como el UCSC Genome Browser o el Integrative Genomics Viewer (IGV). En un segundo paso, se analizaron las regiones enriquecidas en secuencias genómicas alineadas, con respecto a un control (LXR α/β -/-), correspondientes a sitios potenciales de ocupación por los receptores LXR. A partir de los archivos resultantes, que contienen un listado de las regiones genómicas enriquecidas o sitios de ocupación, se anotan a las características genómicas más próximas al sitio de ocupación (principalmente genes, lncRNA, etc...).

En un tercer paso, interrogamos cada una de esas regiones genómicas enriquecidas, para conocer que secuencias o motivos de unión para factores de transcripción pueden haber contenidas en ellas. El resultado de la búsqueda de motivos dará un listado ordenado por el p-valor de aquellos motivos que presentan una mayor frecuencia de aparición en esos listados de regiones genómicas enriquecidas.

Finalmente, a partir de todos estos datos, podemos obtener otros tipos de representaciones gráficas de los resultados de la secuenciación, que nos permiten comprender e interpretar de manera visual y sencilla los resultados obtenidos, como mapas de calor (heatmaps), realizados con

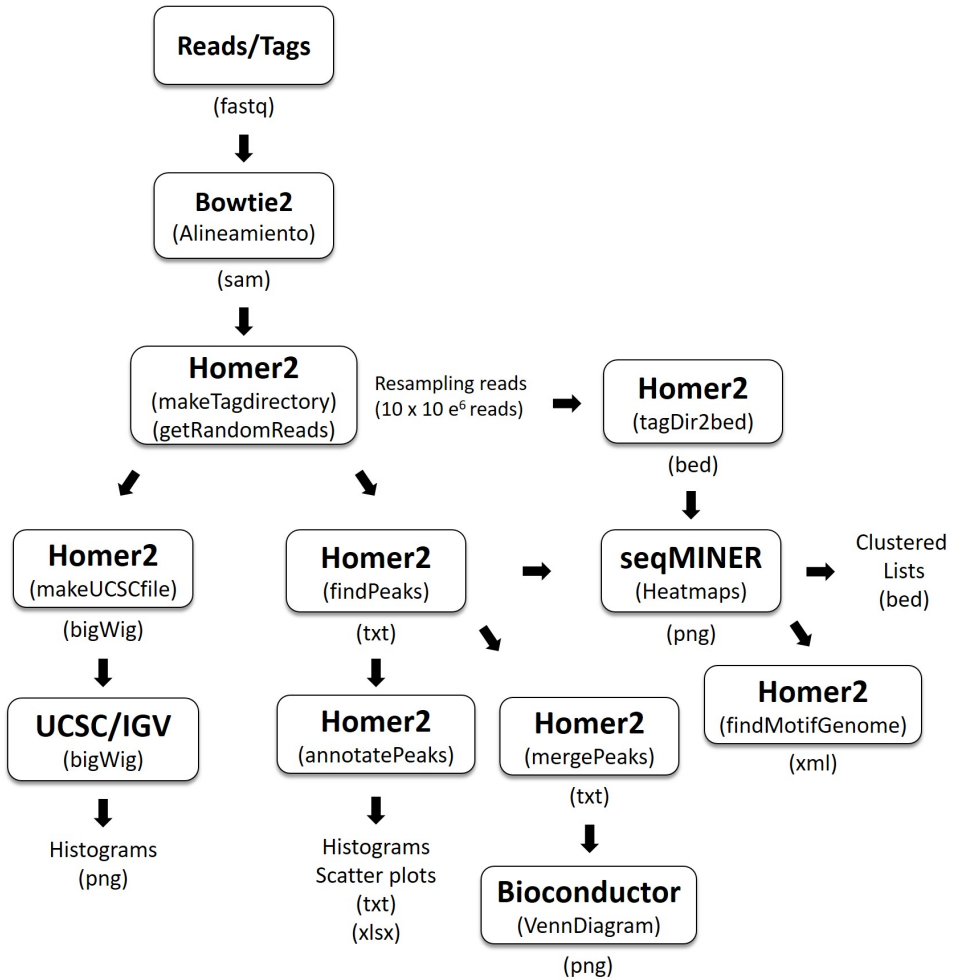


Figura 3. Flujo de trabajo para el análisis de datos de ChIP-seq.

Material y métodos

Seq-MINER (v1.3.4) (Ye et al. 2011), scatter-plots, diagramas de Venn, etc. (de la Rosa et al. 2019).

9. Citometría de flujo.

Para el estudio del papel funcional de LXR α , se utilizó un modelo in vivo en ratón de peritonitis aguda, mediante la administración de mediadores inflamatorios intraperitonealmente durante 24 horas de tratamiento. Las poblaciones de células infiltradas en la cavidad peritoneal se obtuvieron mediante el lavado con 10 ml de PBS frío con EDTA 2,5 mM y BSA al 0,2%. Después de lavar y filtrar utilizando filtros para células de 70 μm (para eliminar restos de agregados tisulares), la suspensión de células se incubó en frío. Para el estudio de inmunofenotipado celular mediante citometría de flujo, las células se incubaron durante 30 minutos en hielo con los siguientes anticuerpos a una dilución de 2 $\mu\text{g/ml}$: CD11b-PE-Cy7, Ly6G-FITC, F4/80-APC y MHC-II-PE. Tras la incubación, se procedió a un lavado suave de las células con PBS-EDTA y posteriormente fueron resuspendidas en tampón FACS. El análisis de viabilidad y de poblaciones mieloides se realizó en el citómetro de flujo BD FACS Canto II (BD Biosciences) utilizando el software FlowJo. Los neutrófilos infiltrados a la cavidad peritoneal tras el tratamiento con los diferentes mediadores inflamatorios fueron detectados por el citómetro de flujo siguiendo el criterio de ser células positivas para los marcadores CD11b y Ly6G: CD11b^{hi}/Ly6G^{hi} de acuerdo con el trabajo publicado previamente (D. G. Thomas et al. 2018). Los macrófagos peritoneales residentes fueron analizados según lo establecido por (Okabe y Medzhitov 2014), para los macrófagos totales CD11b^{hi}/CD115^{hi}, para los macrófagos residentes MHC-II^{lo}/F4/80^{hi} y para los macrófagos inflamatorios MHC-II^{hi}/F4/80^{lo}. Los ensayos in vivo y de citometría fueron realizados en el Instituto de Biomedicina Alberto Sols por Marta Celorio.

Los anticuerpos utilizados para realizar la citometría de flujo se recogen en la (**Tabla 1**):

10. Análisis estadístico.

Los datos de expresión obtenidos por qPCR y los datos de ocupación genómica por CHIP-qPCR se expresaron como la media de los resultados obtenidos de al menos dos o más experimentos independientes. Cada barra en el gráfico está acompañada de \pm el error estándar (SEM). La significancia estadística entre dos grupos fue estimada mediante el test t de Student no pareado, y entre tres o más grupos mediante el análisis de varianza de 1 vía con comparaciones de medias a posteriori, realizadas mediante la prueba de Tukey. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos (*) cuando $p < 0,05$ y muy significativos (**) cuando $p < 0,01$. Para realizar los análisis se utilizó el paquete estadístico Prism6 v6.01 (GraphPad Software).

RESULTADOS

1. Estudio de los receptores LXRs en un modelo de iBMDMs.

Los receptores LXRs están constituidos por las proteínas LXR α y LXR β , que comparten aproximadamente un 77% de homología en su secuencia de aminoácidos. En la gran mayoría de los estudios que se han realizado, ambas proteínas desempeñan funciones reguladoras similares, compartiendo las mismas dianas génicas (Repa y Mangelsdorf 2000). En la actualidad existen muy pocos estudios que describan funciones exclusivas para cada uno de los receptores, como ocurre en el caso del control de la expresión de *Cd51* (Joseph et al. 2004), o la diferenciación de los macrófagos de la zona marginal esplénica (A-Gonzalez et al. 2013), regulados por LXR α , mientras que LXR β preferentemente regula transcripcionalmente la expresión de genes implicados en la homeostasis lipídica y la señalización de esteroides (Bensinger et al. 2008; Mak et al. 2002). En muchos casos, las funciones específicas atribuidas a cada proteína de LXR fueron basadas en experimentos empleando distintos tipos celulares que expresan de manera bastante desigual cada tipo de receptor LXR.

Por lo tanto, para estudiar aquellos papeles funcionales relevantes para un tipo de receptor LXR en particular, desarrollamos un modelo celular de macrófago a partir de células deficientes en LXR, que fueron reconstituidas de forma estable con plásmidos que expresan copias de LXR α o LXR β de manera independiente, y que contienen tres copias del péptido FLAG (3xFLAG) en su extremo amino terminal. Estas células fueron usadas para establecer las acciones transcripcionales individuales de cada tipo de receptor LXR, y la distribución de regiones de ocupación del receptor en el genoma del macrófago de ratón (**Figura 1**).

Resultados

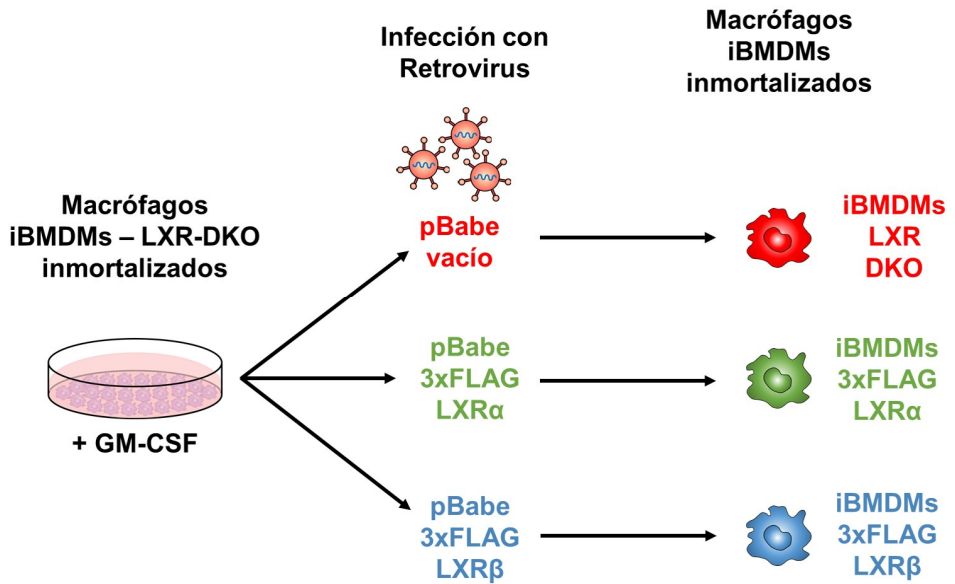


Figura 1. Generación de las líneas de iBMDM-LXR α y iBMDM-LXR β .

Adaptado de (Ramón-Vázquez et al. 2019).

1.1. Caracterización de las líneas celulares iBMDMs.

Una vez reconstituidas las células deficientes en LXR, únicamente se seleccionaron aquellos clones que fueron positivos para 3xFLAG-LXR, y que exhibieron una expresión aproximadamente similar entre los receptores LXR α y LXR β , determinada por WB (**Figura 2**). Para una mejor comprensión, estas líneas celulares fueron denominadas como: iBMDM-DKO, iBMDM-LXR α e iBMDM-LXR β .

Ambos modelos celulares fueron validados por qPCR, los cuales mostraron una correcta inducción de la expresión de los genes diana en respuesta a la activación con el agonista GW3965. Tal y como era de esperar, solo se observó la inducción de la expresión del gen diana *Cd5l* (específico de LXR α), en la línea iBMDM-LXR α tras la estimulación con GW3965 (Ramón-Vázquez et al. 2019).

A continuación, ambas líneas celulares fueron validadas por la técnica de ChIP-qPCR. Para ello, utilizando el anticuerpo comercial anti-FLAG se analizó la ocupación de regiones genómicas reguladoras por los receptores LXRs, de genes diana clásicos como *Myliip*, *Scd1*, *Scd2* o *Srebf1c*. Como se observa en la **Figura 3**, tanto en iBMDM-LXR α como en iBMDM-LXR β se muestra un elevado nivel de enriquecimiento de LXR, con respecto a una región genómica alejada, y con respecto al control negativo iBMDM-DKO, que no expresa ninguna de las dos proteínas. Por otra parte, no se encontraron diferencias en la unión de las proteínas de LXR a sus secuencias diana en el genoma, al comparar los tratamientos entre los agonistas y antagonistas (Ramón-Vázquez et al. 2019).

2. Distribución genómica de los receptores LXR α y LXR β .

Para estudiar la distribución de cada uno de los receptores LXR en el genoma del macrófago de ratón, diseñamos experimentos de ChIP-seq en

Resultados

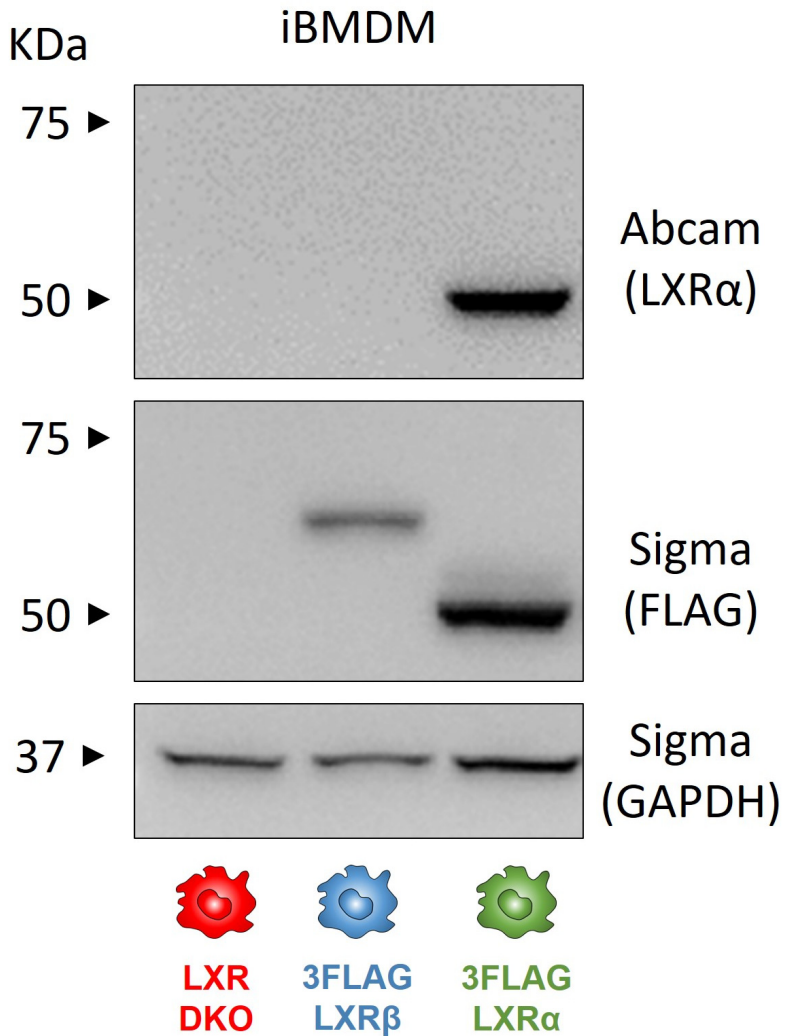


Figura 2. Caracterización por WB de las iBMDMs.

Macrófagos iBMDM-DKO, iBMDM-LXR α e iBMDM-LXR β fueron cultivados en condiciones basales. Posteriormente, se obtuvieron extractos proteicos totales y se analizaron mediante ensayos de Western blot, realizados con anticuerpos específicos. En estos ensayos, se usó la GAPDH como control de carga.

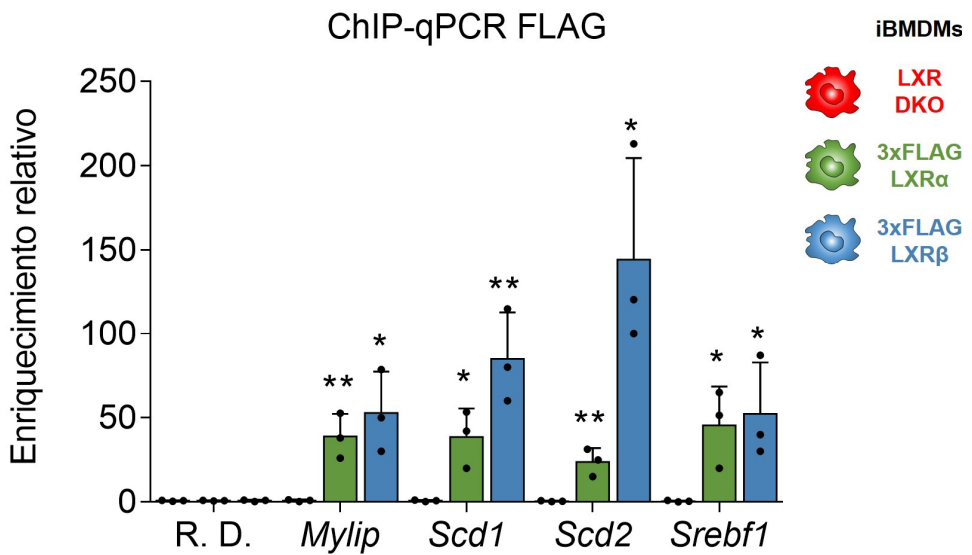


Figura 3. Caracterización por ChIP-pcr de las iBMDMs.

Macrófagos iBMDM-DKO, iBMDM-LXR α e iBMDM-LXR β fueron cultivados en condiciones basales. A continuación, se determinaron los niveles de ocupación por los receptores LXRs en regiones reguladoras de genes diana conocidos, mediante qPCR, utilizando primers específicos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto a iBMDM-DKO.

Resultados

las líneas iBMDM-DKO, iBMDM-LXR α e iBMDM-LXR β en respuesta al tratamiento con GW3965. El análisis de los datos de secuenciación reveló notables diferencias en el número de sitios de ocupación de los receptores LXR (**Figura 4**). De un total de 1125 regiones de ocupación genómica, LXR β se encontró presente en 1.021 de estas regiones, mientras que LXR α solo fue detectado en 606 regiones. Del total de las regiones ocupadas, 502 regiones se correspondieron a sitios de ocupación comunes para ambos receptores LXR, representando un 49% de las regiones ocupadas por LXR β y el 83% de las regiones ocupadas por LXR α (**Figura 4**). Por otra parte, se observó una marcada diferencia de aproximadamente un 50%, correspondiente a regiones de ocupación específicas de LXR β , que no estaban siendo ocupadas por LXR α . Estos datos indican que mayoritariamente, las regiones de ocupación en el genoma de LXR α en cultivos de macrófagos, están siendo compartidos con LXR β (regiones "duales"), mientras que LXR β muestra una distribución muy diferente, mostrando prácticamente la misma proporción de regiones ocupadas "duales", que de regiones específicas para ese receptor.

Cuando se estudiaron las características genómicas (proximidad a sitios de inicio de la transcripción (TSS), sitios de terminación de la transcripción (TTS), exones, intrones, regiones intergénicas, etc.), los resultados revelaron porcentajes similares entre los diferentes grupos detectados (Ramón-Vázquez et al. 2019). A continuación, comparamos las distribuciones de ocupación genómica de los receptores LXR con la presencia del Receptor de Retinoide X alfa (RXR α), a partir de los datos de ChIP-seq de la base de datos en NCBI (número de acceso GSE63698).

Como se observa en la **Figura 4**, el receptor RXR α fue detectado en la gran mayoría de las regiones ocupadas por LXR. Sin embargo, las regiones de ocupación de RXR α mostraron una mayor presencia en las regiones genómicas compartidas por LXR α y LXR β . Por lo tanto, las

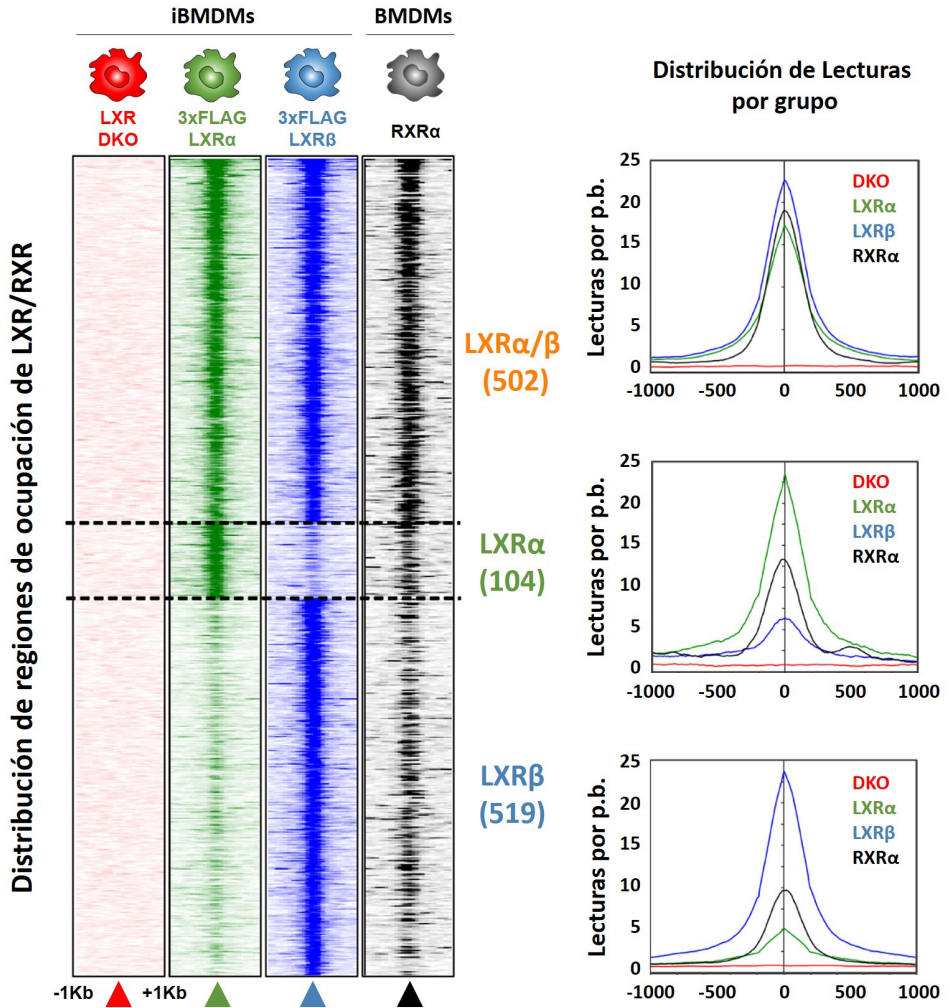


Figura 4. Análisis del ChIP-seq en iBMDM-LXR α , iBMDM-LXR β y RXR en BMDMs.

Mapa de calor de densidades de lecturas de LXR α , LXR β y RXR α en una ventana de 2Kb (**panel izquierdo**) (Ramón-Vázquez et al. 2019). Las regiones genómicas se agrupan de acuerdo con las ocupaciones específicas de LXR α y LXR β , y las ocupaciones compartidas por LXR α/β . (**paneles derecha**) Distribución de lecturas de cada uno de los grupos de LXR y RXR (lecturas de ChIP-seq por p.b.).

Resultados

regiones de unión de LXR/RXR α podrían clasificarse en tres grupos: regiones de ocupación específicos de receptor LXR (LXR α o LXR β) y regiones de ocupación compartidas o “duales”.

Para caracterizar aún más las regiones de ocupación de los diferentes grupos de LXR detectados, se analizaron los patrones de secuencias de unión (“motivos”) compartidos por las diferentes regiones genómicas ocupadas por LXR. Para ello se realizó una búsqueda de secuencias repetidas en las regiones genómicas de los tres grupos de ocupación de LXR/RXR α con el software HOMER (**Figura 5**). Los resultados de la búsqueda determinaron que la secuencia más enriquecida en todos los grupos fue un elemento de respuesta a LXR, (LXRE DR4), seguido de diversas secuencias de motivos asociados a receptores nucleares en los grupos LXR α / β y LXR β . Por otra parte, el análisis de motivos de secuencias *de novo* (de nuevo descubrimiento), reveló que los motivos LXRE y COUP-TFII estaban presentes en todos los grupos de manera apreciable. Este análisis también determinó la presencia de algunas secuencias repetidas en los lugares de unión de LXR duales, o únicamente en uno de los grupos de regiones de ocupación específico de LXR, como es el caso de PBX1, que se encuentra enriquecido solo en el grupo de regiones de ocupación específicas de LXR α , o las secuencias de motivos BATF y C/EBPA, enriquecidos únicamente en el grupo específico de LXR β (**Figura 5**).

Dadas las diferencias existentes en las distribuciones de regiones de ocupación por los receptores LXR, se llevó a cabo un análisis de las posibles funciones biológicas que puedan estar asociadas a los genes ubicados en la inmediata proximidad a las regiones de unión de los diferentes grupos establecidos, denominado estudio de Ontología Genética (GO). Los resultados de este análisis determinaron que los genes próximos a las regiones genómicas ocupadas por ambos LXR (“dual”), están relacionados con funciones en el metabolismo lipídico y del

Motivos de novo			Motivos conocidos			
Motivos	Factor	p-valor	Motivos	Factor	p-valor	
	COUP-TFII (NR)	1e ⁻¹⁰²		LXRE (NR)	1e ⁻²²⁴	LXRα/β
	SpiB (ETS)	1e ⁻²⁷		THRα (NR)	1e ⁻⁵⁷	
	LXRE (NR)	1e ⁻²⁵		COUP-TFII (NR)	1e ⁻⁵⁶	
	CEBPE	1e ⁻¹⁸		Erra (NR)	1e ⁻³²	
	JunB (bZIP)	1e ⁻¹⁷		THRβ (NR)	1e ⁻³¹	
	LXRE (NR)	1e ⁻¹¹		LXRE (NR)	1e ⁻³⁷	LXRα
	Erra (NR)	1e ⁻¹⁰		PU.1 (ETS)	1e ⁻⁵	
	PBX1	1e ⁻⁹		Etv2 (ETS)	1e ⁻⁴	
	PU.1 (ETS)	1e ⁻⁸		ETS1 (ETS)	1e ⁻⁴	
	ETS:RUNX	1e ⁻⁷		ERG (ETS)	1e ⁻³	
	COUP-TFII (NR)	1e ⁻¹²⁶		LXRE (NR)	1e ⁻¹⁰²	LXRβ
	CEBPA	1e ⁻⁴²		COUP-TFII (NR)	1e ⁻⁹⁴	
	BATF (bZIP)	1e ⁻²¹		THRβ (NR)	1e ⁻⁵⁷	
	ESRRB	1e ⁻¹²		ESRRB	1e ⁻⁴⁴	
	SpiB (ETS)	1e ⁻¹¹		FXR (NR)	1e ⁻³⁵	

Figura 5. Análisis de patrones de secuencias de unión para TFs.

Búsqueda de patrones de secuencias (“motivos”) de unión para TFs, de novo y conocidos con HOMER, asociados a las regiones genómicas de ocupación de LXR/RXRα en iBMDM.

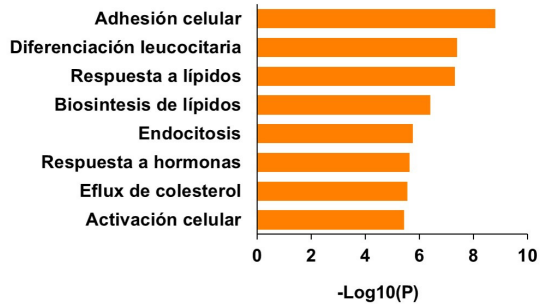
Resultados

colesterol. Además, también se encontraron términos de funciones asociadas con los leucocitos y la homeostasis de células no inmunocompetentes. Por otra parte, los genes próximos a las regiones genómicas de los grupos de ocupación específicos para cada receptor LXR, mostraron funciones muy heterogéneas, siendo las más importantes, la hemostasis y la diferenciación celular para el grupo específico de LXR α y la regulación de los procesos de unión al ADN y la transducción de señales para el grupo LXR β (**Figura 6**).

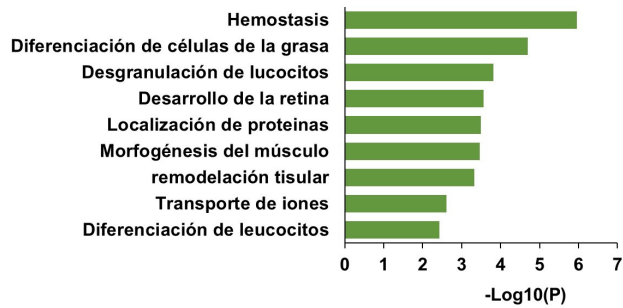
Con el fin de profundizar en los posibles mecanismos de acción de los receptores LXR, sobre la regulación transcripcional de la expresión de genes diana, en los diferentes grupos de regiones de ocupación genómica por LXR, desarrollamos experimentos de ChIP-seq para el estudio de la modificación H3K27ac de las colas de las histonas nucleosomales, tras el tratamiento farmacológico con GW3965 y GW233. Como se describió en la introducción de esta memoria, esta modificación está directamente relacionada con la actividad transcripcional (Creyghton et al. 2010; Heintzman et al. 2009). Para este análisis, utilizamos una estrategia farmacológica que consiste en el empleo del agonista GW3965 (máxima activación transcripcional), frente al antagonista GW233 (máxima represión transcripcional), tal y como se muestra en la **Figura 7**. El análisis de los cambios dinámicos de la marca H3K27ac en las proximidades de las regiones de ocupación de LXR (en una ventana de 2 kb alrededor del centro de su sitio de ocupación), después del tratamiento farmacológico de 24 horas, se representa con un gradiente de colores proporcional a la densidad de lecturas de secuenciación enriquecidas en dichas regiones (**Figura 7**).

Los datos obtenidos por este análisis, permitieron identificar dos tipos de regiones con la marca H3K27Ac: las regiones que respondieron farmacológicamente a los ligandos sintéticos, y las que respondieron

Grupo regiones de unión de LXR α β



Grupo regiones de unión de LXR α



Grupo regiones de unión de LXR β

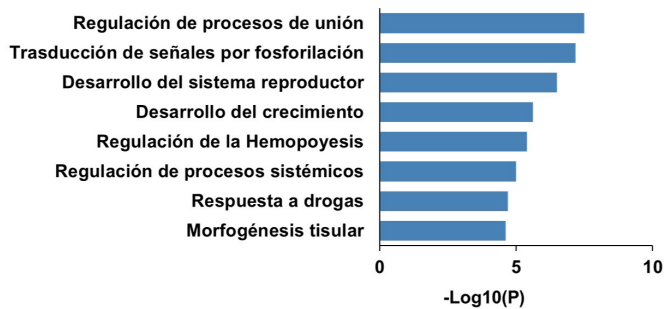


Figura 6. Análisis de las funciones biológicas de genes próximos a las regiones ocupadas por LXR.

Análisis de las funciones biológicas asociadas a los genes próximos a los diferentes grupos de regiones genómicas de ocupación de LXR/RXR α en iBMDM, mediante la plataforma web Metascape (Zhou Y et al, 2019).

Resultados

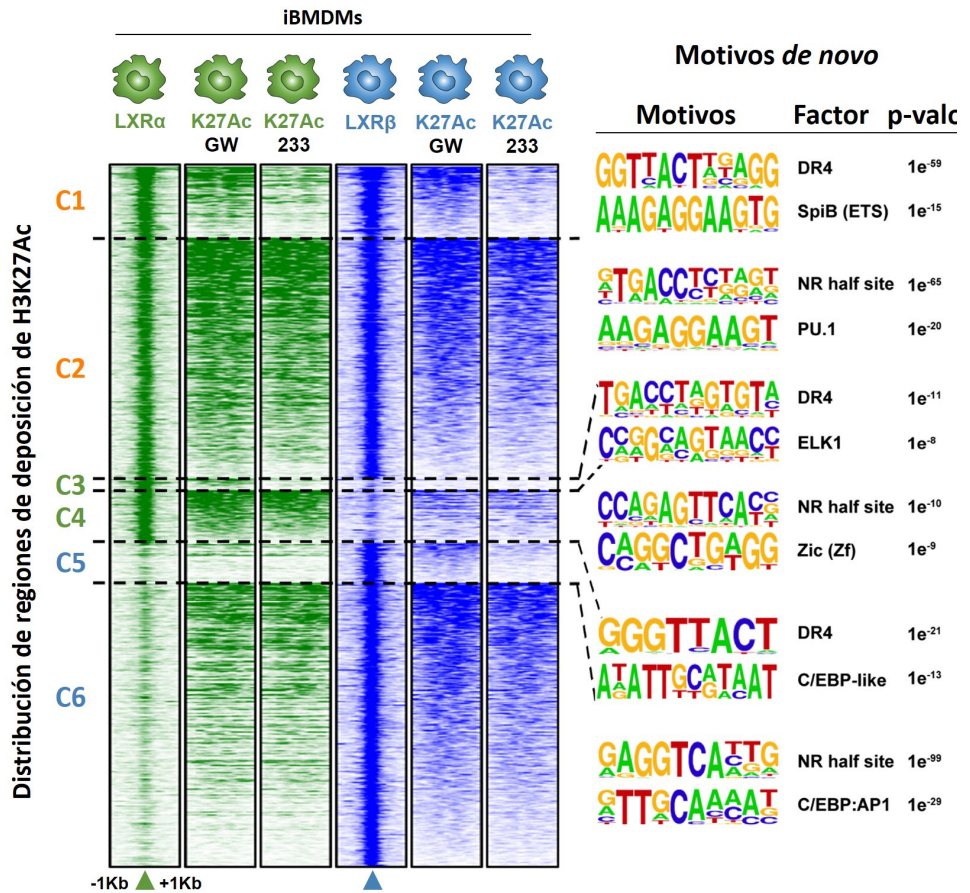


Figura 7. Análisis del ChIP-seq de H3K27Ac en células iBMDM-LXR α y iBMDM-LXR β .

Cambios en las marcas de acetilación H3K27ac (**panel izquierdo**) tras el tratamiento con fármacos agonistas y antagonistas en macrófagos iBMDM, en una ventana de 2Kb del centro del sitio de unión de LXR, y sus principales motivos de secuencia identificados en cada uno de los grupos. Búsqueda de secuencias patrón para TFs (**panel derecho**), de novo con HOMER, asociados a los sitios de unión de LXR agrupados por los cambios en las marcas de acetilación.

deficientemente o no fueron capaces de responder al tratamiento farmacológico. Sorprendentemente, la gran mayoría de las regiones acetiladas se correspondieron al segundo grupo identificado, en cada uno de los tres grupos de regiones ocupadas por LXR. Las regiones genómicas acetiladas asociadas a sitios de ocupación por LXR se subdividieron y organizaron en grupos, atendiendo a la capacidad de respuesta farmacológica (C1-2 para regiones de ocupación por LXR “duales”, C3-4 regiones específicas de LXR α y C5-6 específicas de LXR β) (**Figura 7**). El análisis de motivos de secuencia *de novo*, realizado con HOMER en cada uno de los grupos detectados, estableció que el motivo de secuencia más enriquecido, en regiones genómicas ocupadas por LXR, que respondieron adecuadamente al tratamiento farmacológico (C1, C3 y C5), fue un LXRE clásico (DR-4). Sin embargo, aquellas regiones que respondieron deficientemente o fueron insensibles al tratamiento farmacológico, mostraron un mayor enriquecimiento para la mitad de un sitio de LXRE (C2, C4 y C6). La cuantificación de los cambios dinámicos observados en las regiones modificadas por H3K27Ac, en respuesta a los tratamientos farmacológicos, se representaron en diagramas de cajas, como el (Log2) del número de lecturas de secuenciación enriquecidas dentro de la ventana de 2 Kb (Ramón-Vázquez et al. 2019).

3. Expresión genómica en las líneas de iBMDM.

Para explorar la posibilidad de que la unión diferencial de los receptores LXR al genoma esté vinculada a programas de expresión génica específicos para cada tipo de receptor LXR, realizamos un análisis de la expresión génica global, utilizando la técnica de microarray, a partir del mRNA de células estimuladas con GW3965 (máxima activación) y GW233 (represión máxima). Los datos de expresión génica fueron relativizados de dos maneras: 1) los valores de expresión en respuesta al tratamiento con GW3965 se representaron en relación al tratamiento con

Resultados

GW233 en cada línea celular iBMDM y, alternativamente, 2) los valores de expresión en cada condición de tratamiento fueron representados en relación a los valores de expresión obtenidos en la línea iBMDM-DKO. El primer tipo de análisis tiene como objetivo explorar aquellos genes que son inducidos/reprimidos por los ligandos sintéticos, mientras que el segundo tipo de análisis se centra en aquellos genes inducidos/reprimidos por la expresión ectópica de cada receptor de LXR, comparado con su control negativo iBMDM-DKO. Los cambios en los niveles de expresión se representaron mediante mapas de calor por separado, dependiendo de que la expresión estuviera mediada por LXR α/β (**Figura 8**), LXR α (**Figura 9**) o LXR β , (**Figura 10**). El número de genes expresados diferencialmente en cada caso se indica en el lado derecho de cada mapa de calor.

Este análisis reveló tres posibles mecanismos de regulación transcripcional o modos de acción, que designamos como I, II y III (mapas de calor en las **Figuras 8A, 9A y 10A**). El modo de acción I implica una regulación de la transcripción sensible al tratamiento farmacológico, en el que la ausencia del receptor LXR muestra unos niveles de expresión mucho mayores que cuando está presente el receptor, es decir que muestra un nivel de expresión elevado en las células iBMDM-DKO, a pesar de su deficiencia en LXR. El modo II representa el modelo canónico para la activación transcripcional, donde la unión del agonista al heterodímero LXR/RXR desencadena un cambio conformacional que desplaza al complejo correpresor, lo que facilita la interacción con los complejos coactivadores. Los niveles de expresión dependen en gran medida de la activación farmacológica de LXR y de la presencia concomitante de los receptores LXR en la célula. En este modo de acción, el nivel de expresión de estos genes es mucho mayor en las células que expresan el receptor LXR que en las células iBMDM-DKO, con el tratamiento con GW3965.

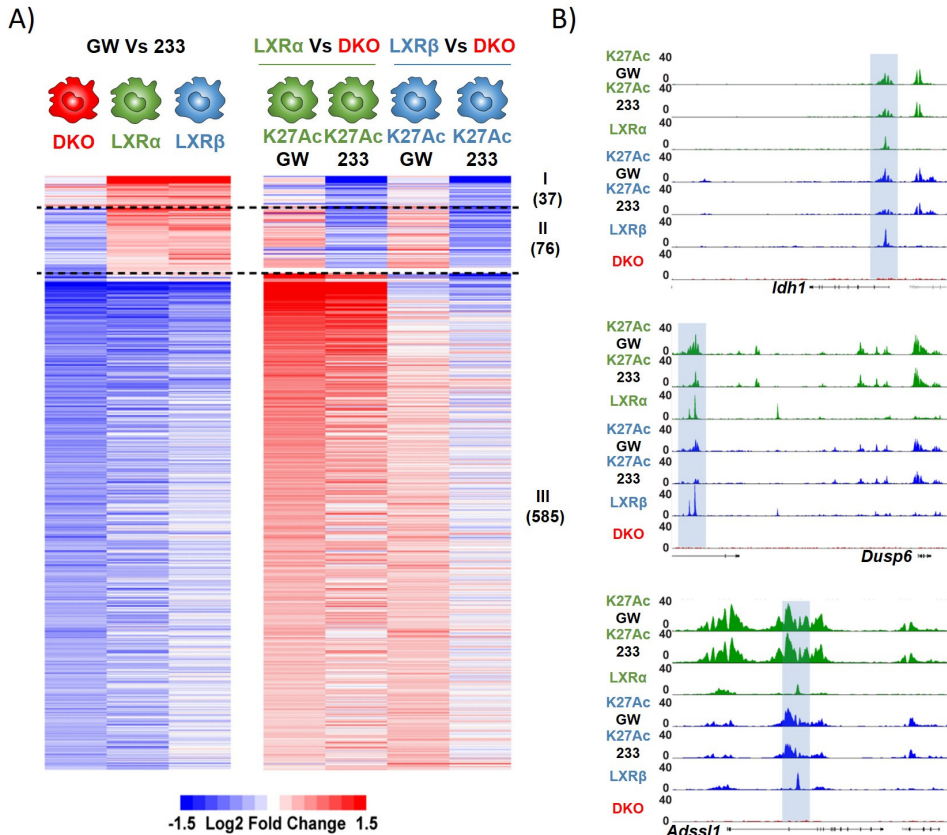


Figura 8. Análisis de la expresión diferencial por microarray de genes regulados por iBMDM-LXR α y iBMDM-LXR β .

(A) Macrófagos iBMDM-DKO, iBMDM-LXR α e iBMDM-LXR β fueron incubados en presencia de GW3965 (1 μ M) o GW233 (2 μ M) durante 24 horas. Los niveles de mRNA fueron analizados mediante la técnica de microarray. Los datos relativizados destacan tres posibles mecanismos de activación génica (modos I, II, III) mediados por LXR α/β . El número de transcritos inducidos por cada mecanismo se indica a la derecha del mapa de calor. (B) Capturas del navegador genómico UCSC de genes diana representativos como ejemplo de cada mecanismo.

Resultados

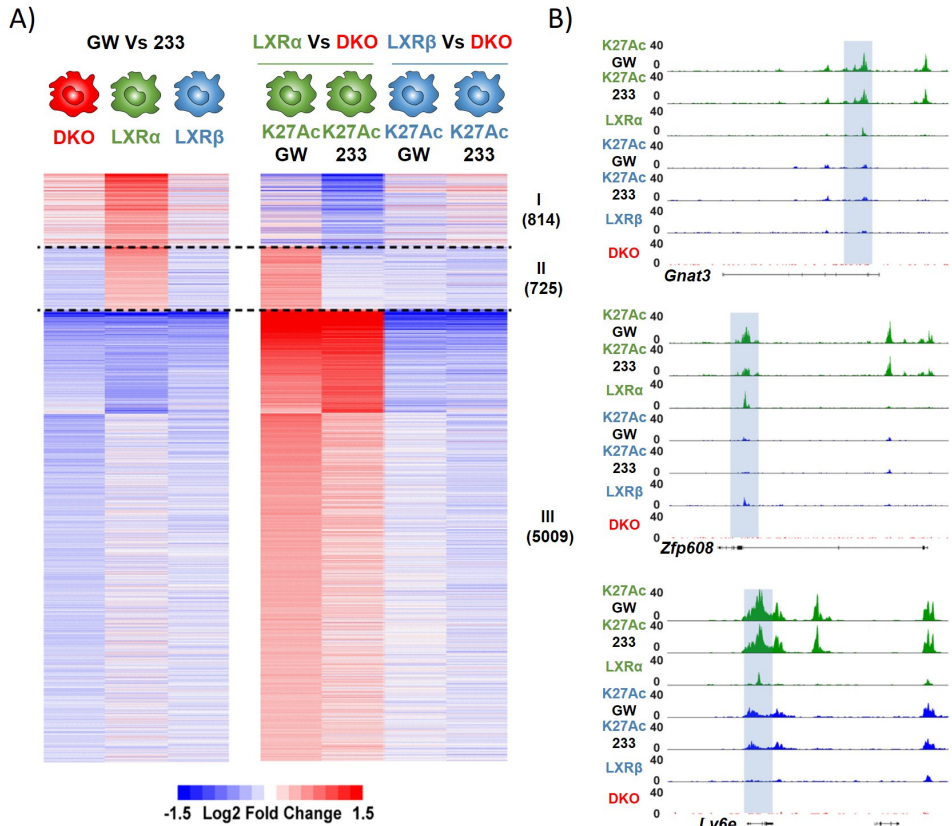


Figura 9. Análisis de la expresión diferencial por microarray de genes regulados por iBMDM-LXR α .

(A) Macrófagos iBMDM-DKO, iBMDM-LXR α e iBMDM-LXR β fueron incubados en presencia de GW3965 (1 μ M) o GW233 (2 μ M) durante 24 horas. Los niveles de mRNA fueron analizados mediante la técnica de microarray. Los datos relativizados destacan tres posibles mecanismos de activación génica (modos I, II, III) mediados por LXR α . El número de transcritos inducidos por cada mecanismo se indica a la derecha del mapa de calor. (B) Capturas del navegador genómico UCSC de genes diana representativos como ejemplo de cada mecanismo.

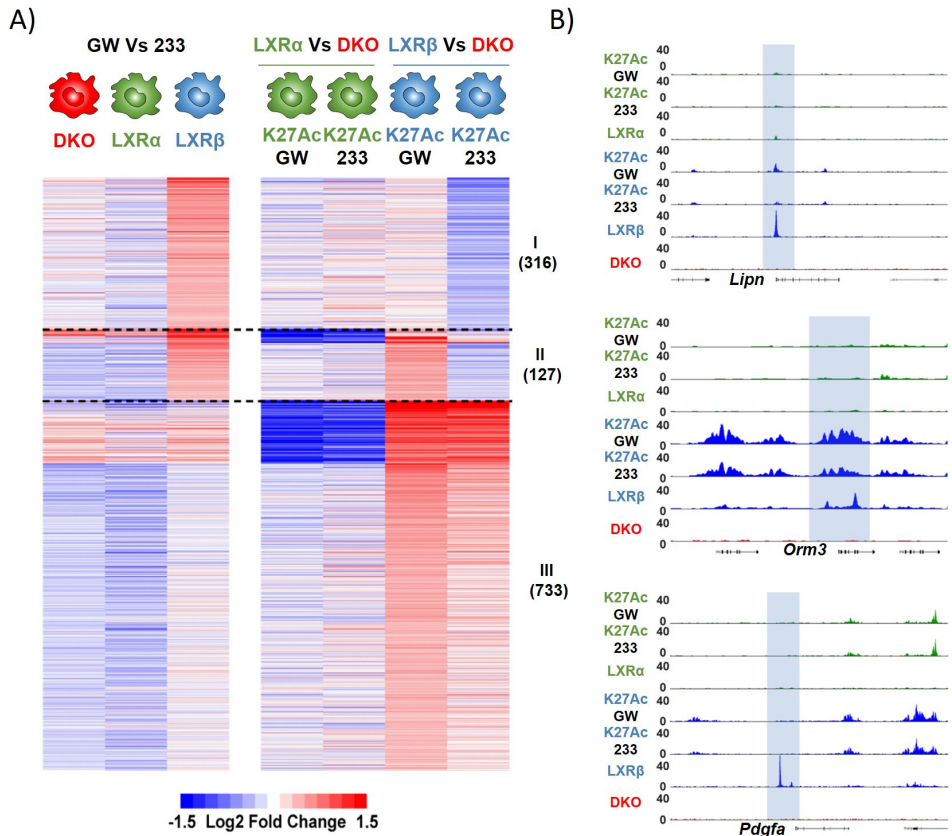


Figura 10. Análisis de la expresión diferencial por microarray de genes regulados por iBMDM-LXR β .

(A) Macrófagos iBMDM-DKO, iBMDM-LXR α e iBMDM-LXR β fueron incubados en presencia de GW3965 (1 μ M) o GW233 (2 μ M) durante 24 horas. Los niveles de mRNA fueron analizados mediante la técnica de microarray. Los datos relativizados destacan tres posibles mecanismos de activación génica (modos I, II, III) mediados por LXR β . El número de transcritos inducidos por cada mecanismo se indica a la derecha del mapa de calor. (B) Capturas del navegador genómico UCSC de genes diana representativos como ejemplo de cada mecanismo.

Resultados

Por último, en el modo de acción III, los niveles de expresión se producen de una manera independiente al tratamiento farmacológico, es decir la expresión de estos genes no responde al mismo. Los valores de expresión en las líneas que expresan LXR de manera ectópica son más altos, en comparación con los macrófagos iBMDM-DKO en condiciones de tratamiento tanto con agonistas como con antagonistas, por lo que este modo de acción muestra una cierta dependencia del receptor LXR, pero no de su capacidad transactivadora. En la (**Figuras 8B, 9B y 10B**), se muestran regiones de ocupación de los receptores LXR y sus modificaciones H3K27Ac, de algunos ejemplos de genes representativos del microarray donde se muestran cada uno de los modos de acción descritos.

Aproximadamente unos 113 transcritos fueron inducidos conjuntamente por LXR α y LXR β después de la activación farmacológica por GW3965 (**Figura 8A**, modos I y II). Sorprendentemente, la activación específica de LXR α por el agonista promovió la expresión de un número muy elevado de genes \sim 1,539 transcritos (**Figura 9A**, modos I y II), mientras que la activación de LXR β indujo la expresión de \sim 450 genes (**Figura 10A**, modos I y II). Por otra parte, estos análisis revelaron que los modos de acción I y II mostraron un menor número de genes inducidos, que los observados en el modo III, para todas las categorías de receptores. Inesperadamente, el número de genes regulados por LXR α fue un orden de magnitud mayor que por LXR β . Estos resultados resaltan que LXR α , a pesar de estar presente en un número mucho más reducido de regiones genómicas que LXR β , parece poder promover la transactivación de un amplio conjunto de genes (**Figura 9A**). En conjunto, estos resultados proporcionan la primera indicación de que los receptores nucleares LXR regulan la expresión génica a través de tres modos de acción transcripcional distintos.

4. Correlación entre los datos de expresión y de ChIP-seq.

A continuación, evaluamos la correlación existente entre los datos de expresión génica y los de ocupación genómica por los receptores LXR α y LXR β . Este tipo de análisis permite distinguir entre genes dianas directos de LXR, cuya expresión puede ser regulada directamente por la influencia de una región próxima o quizás algo distante de LXR, y dianas indirectas, cuya expresión pueden ser regulada mediante la expresión de otras proteínas que si son dianas directas de LXR. Para llevar a cabo este análisis, asociamos cada región de ocupación de LXR a los genes más próximos dentro de una ventana de ± 25 Kb en ambas direcciones del centro de cada región de ocupación por LXR. Esta correlación generó dos listados de genes: una por cada receptor LXR. Las listas de genes resultantes fueron comparadas con los resultados de expresión génica por microarray, realizados en iBMDM-LXR α e iBMDM-LXR β respectivamente, mediante el Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos de Genes (“Gene Set Enrichment Analysis”, GSEA). En ambos casos, el análisis realizado con GSEA reveló que existe una fuerte correlación entre aquellos genes que presentan regiones de ocupación por LXR en su proximidad, que son inducidos por el agonista GW3965 (**Figura 11**). Las regiones ocupadas por LXR α se correlacionaron positivamente con 138 genes regulados positivamente por el tratamiento con GW3965 en el microarray, mientras que LXR β lo hizo con 266 genes. Estos resultados sugieren que LXR α posiblemente pueda estar regulando la expresión de la gran mayoría de los genes a través de mecanismos indirectos, ya que tan solo se correlacionaron 138 genes de los 1,500 que aparecen regulados en el microarray. Por otra parte, a diferencia de LXR α , algo más de la mitad de los genes regulados por el tratamiento con GW3965 (266/450) muestran regiones de ocupación de LXR β en su vecindad. De manera global, estos análisis de correlación apoyan firmemente la idea de que las regiones ocupadas por LXR promueven principalmente la regulación positiva de la

Resultados

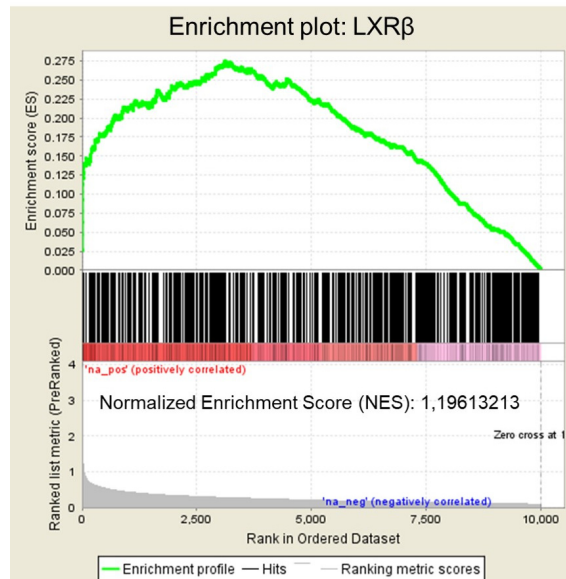
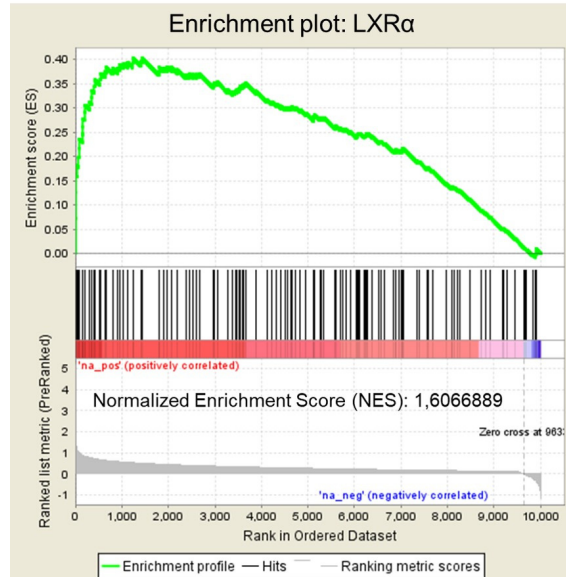


Figura 11. Correlación entre los datos de microarray y ChIP-seq en iBMDM.

Análisis bioinformático para determinar la correlación existente entre los genes de microarray y ChIP-seq con GSEA.

expresión génica, más que la regulación negativa o represión génica, ya que no se mostró correlación con genes reprimidos.

Por otra parte, mediante un análisis bioinformático de enriquecimiento de procesos biológicos (“Ingenuity Pathway Analysis”, IPA) y de Ontología Génica (GO) para los grupos de genes incluidos dentro de los modos de acción I y II, encontramos que los genes regulados por LXR α/β , así como genes regulados específicamente por LXR α , se encuentran relacionados con funciones biológicas ligadas al metabolismo lipídico, y también fueron vinculados a vías y funciones relacionadas con la síntesis de esteroides y la migración de células mieloides respectivamente. Por otra parte, aquellos genes que fueron regulados por LXR β se asocian con funciones relacionadas con la respuesta de fase aguda y el transporte mediado por vesículas. El análisis de los genes incluidos dentro del modo de acción III, reveló una serie de funciones completamente inesperadas para cada grupo de receptores LXR. Este análisis vinculó los genes regulados dualmente por LXR α y LXR β a funciones en la replicación del ADN y el procesamiento de rRNA, los genes regulados específicamente por LXR α a funciones en la respuesta inflamatoria y la movilización celular, mientras que los genes regulados solo por LXR β se relacionaron con funciones vinculadas a la diferenciación de los linfocitos, el desarrollo del sistema inmune y la respuesta celular al Fe²⁺ (Ramón-Vázquez et al. 2019).

5. Expresión del receptor LXR α en la inflamación.

Debido a que los resultados anteriores indican que ambas isoformas de LXR no solo comparten numerosas acciones transcripcionales comunes, sino que también son capaces de regular la expresión de genes con funciones exclusivas no redundantes, en especial la respuesta inflamatoria y la migración celular, nos propusimos estudiar las posibles implicaciones de los receptores LXR durante las distintas fases de la

Resultados

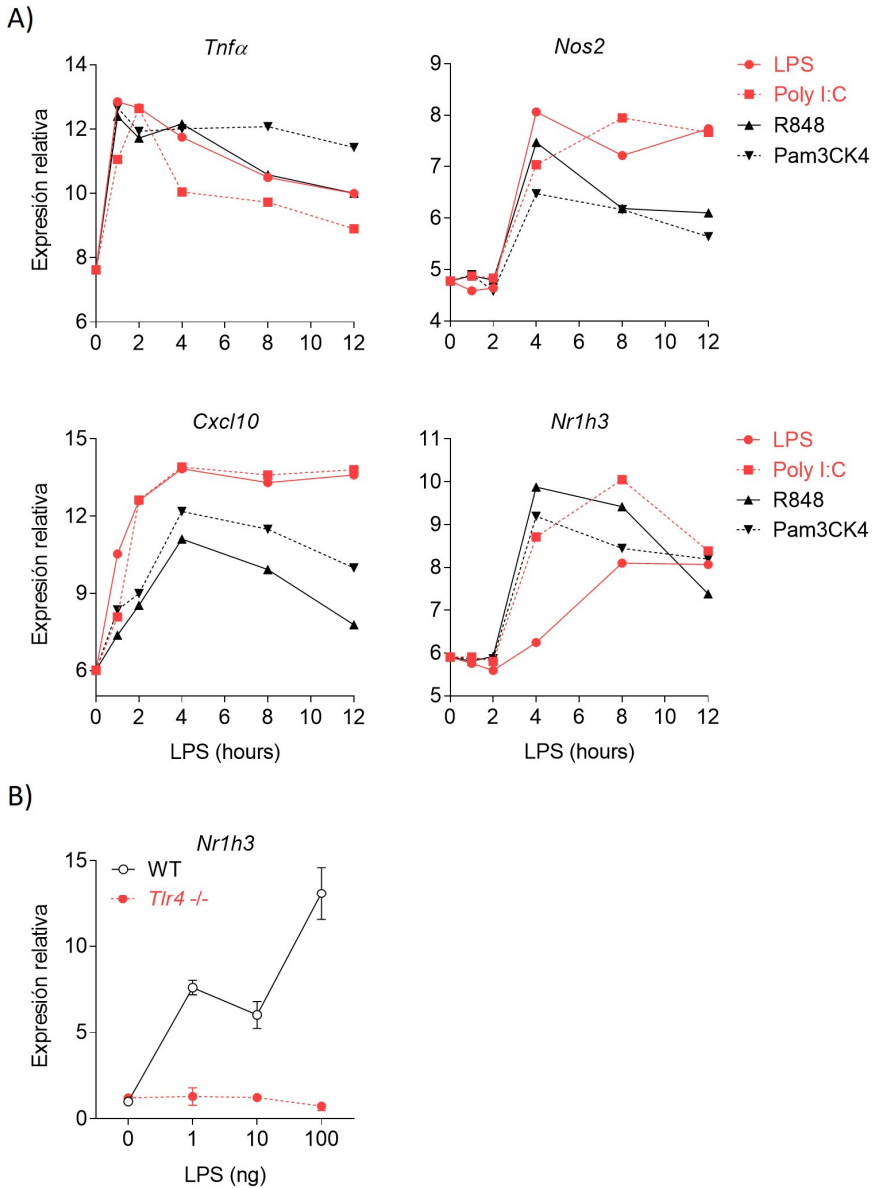
señalización inflamatoria inducida por los receptores TLR, ya que ésta nunca ha sido estudiada en profundidad.

5.1. Expresión de los receptores LXRs por mediadores inflamatorios.

Para investigar cómo se ven afectados los niveles de expresión de los receptores LXR en BMDMs, durante el tratamiento con diferentes mediadores de la respuesta inflamatoria, se analizaron datos públicos de microarrays realizados en BMDMs y previamente publicados (Ramsey et al. 2008). La activación de los receptores TLR desencadenada por los tratamientos con LPS (TLR4), Poly I:C (TLR3), PAM3CSK4 (TLR2) y R848 (TLR7 y TLR8) condujeron a un incremento en los niveles de expresión de genes inflamatorios regulados en distintas fases de la respuesta inflamatoria: temprana (*Tnf*), intermedia (*Cxcl2*) y tardía (*Nos2*), tal y como se muestra en la (**Figura 12A**). Por otra parte, la exposición a los agonistas de TLR elevaron los niveles de expresión de *Nr1h3* (LXR α), incrementándolos hasta las 12 horas de tratamiento (**Figura 12A**), de la misma manera que es expresado *Nos2*. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de expresión de LXR β en respuesta a los agonistas de TLR (datos no mostrados).

Para comprobar la especificidad de la señalización TLR sobre la inducción de LXR α , realizamos un ensayo de dosis-respuesta con LPS (0 – 100 ng) en BMDMs WT y TLR4 $-/-$ estimuladas durante 24 horas. La exposición al LPS incrementó los niveles de expresión del mRNA de LXR α , mostrando una dependencia de la dosis de LPS en células WT, mientras que su expresión no se vio alterada en macrófagos TLR4 $-/-$ (**Figura 12B**).

A continuación, evaluamos la expresión de LXR α en respuesta al LPS en diferentes tipos de macrófagos primarios. Para ello, BMDMs y macrófagos peritoneales fueron cultivados en presencia o ausencia de LPS



Resultados

durante 24 horas. Sorprendentemente, los análisis de WB revelaron que los niveles de expresión de LXR α aumentaron significativamente en respuesta al tratamiento con LPS en comparación con su control en BMDMs. Por el contrario, en los macrófagos peritoneales no se observaron cambios entre el tratamiento con LPS y su control, siendo los niveles de expresión basal de LXR α elevados frente a los observados en BMDM (**Figura 13**). Por tanto, los niveles de LXR α aumentan considerablemente en respuesta a LPS en BMDM, mientras que en macrófagos peritoneales permanecen altos basalmente e inalterados al insulto inflamatorio.

5.2. Expresión diferencial entre LXR α y LXR β en respuesta al LPS en BMDMs.

Para determinar en nuestro laboratorio, si la señalización TLR4 regula los niveles de expresión de ambas isoformas de LXR, se analizaron los niveles de expresión génica mediante qPCR, en BMDMs WT tratadas durante 24 horas con LPS. Los resultados de este experimento revelaron que el LPS aumentó los niveles de expresión de *Nr1h3* (LXR α) a las 24 horas, pero no los niveles de expresión de *Nr1h2* (LXR β). Estos datos sugieren que el incremento en los niveles de expresión de LXR α podría desempeñar un papel relevante durante el transcurso de la respuesta inflamatoria en células BMDMs. (**Figura 14A**).

A continuación, para establecer el espacio de tiempo en el que se alcanzan los niveles máximos de expresión de la proteína LXR α , se realizó un experimento de WB en BMDM WT tratadas con LPS en un rango de tiempos que variaron entre (0 – 48 horas). Los resultados obtenidos de este experimento mostraron que la expresión de LXR α fue máxima a las 24 horas. A las 48 horas de tratamiento con LPS los niveles de expresión de LXR α se redujeron más de la mitad, manteniéndose en unos niveles ligeramente por encima del control (**Figura 14B**). Cuando comparamos los

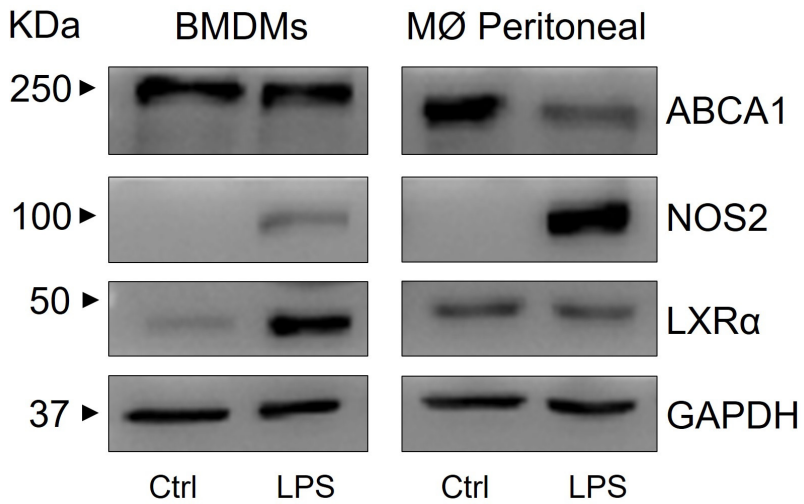


Figura 13. Expresión de LXRα en distintos cultivos de macrófagos.

Células primarias BMDMs y macrófagos peritoneales fueron cultivados en ausencia (Ctrl) o presencia de LPS (100 ng/ml) durante 24 horas. Extractos de proteínas totales fueron analizados mediante ensayos de Western blot con anticuerpos específicos. En estos ensayos se usó la GAPDH como control de carga.

Resultados

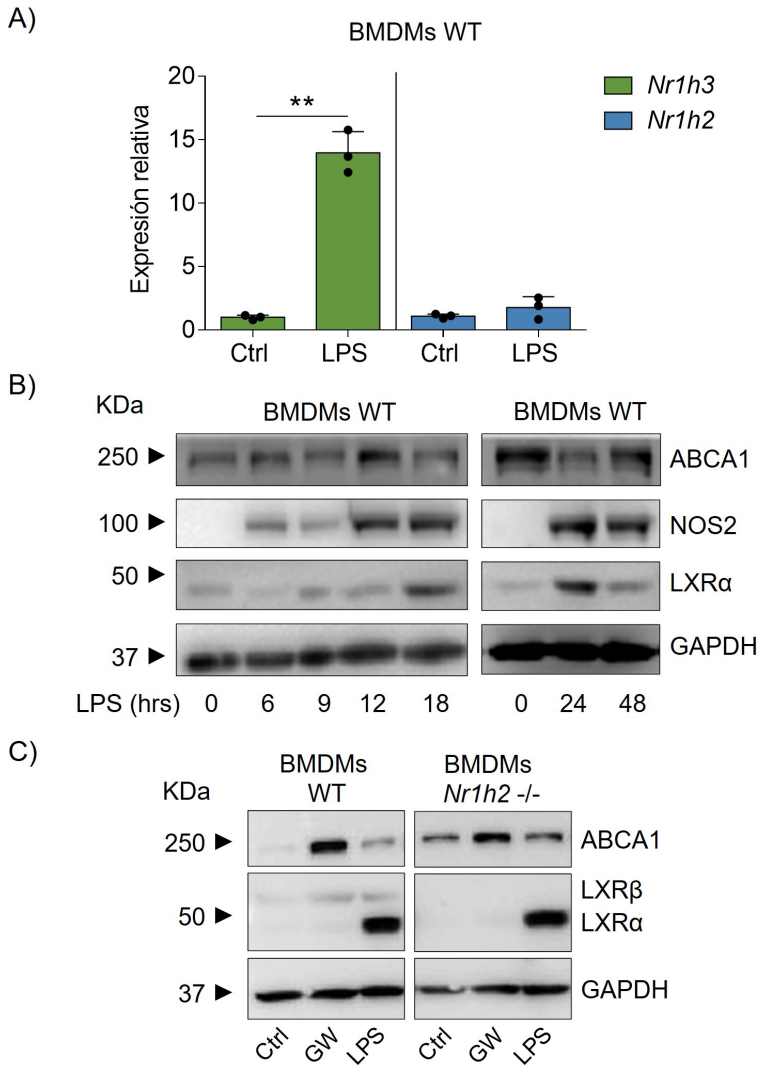


Figura 14. Expresión diferencial de LXR α y LXR β en BMDM.

A) Células BMDMs WT fueron cultivadas en ausencia (Ctrl) o presencia de LPS (100 ng/ml) durante 24 horas. Los niveles de mRNA fueron analizados (previa síntesis de cDNA) mediante qPCR con cebadores específicos para cada gen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al control. **B)** Células BMDMs WT fueron cultivados en ausencia (Ctrl), presencia de LPS (100 ng/ml) o **C)** GW3965 (1 μ M) durante los tiempos establecidos o **C)** 24 horas. Extractos de proteínas totales fueron analizados mediante ensayos de Western blot con anticuerpos específicos. En estos ensayos se usó la GAPDH como control de carga.

niveles de expresión de LXR α con los de la proteína inflamatoria NOS2, observamos que siguen un patrón de expresión en el tiempo muy similar, tal y como fue descrito en la **Figura 12A**. A pesar de observarse un incremento en los niveles de expresión de la proteína LXR α , no se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de la proteína ABCA1, el gen diana clásico de LXR.

Para profundizar en el estudio de la expresión de LXR α inducida por la exposición al LPS, se compararon BMDM WT y LXR β -/- entre sí, en respuesta al LPS y al agonista de LXR, GW3965 a las 24 horas de tratamiento. Estos experimentos mostraron una vez más que el efecto del LPS es específico para la proteína LXR α , mostrando un incremento en los niveles de proteína sobre el control en respuesta al LPS (**Figura 14C**). Por el contrario, los niveles de LXR β no sufrieron cambios aparentes. Por otra parte, al analizar los niveles de la proteína ABCA1, no se observaron cambios significativos en respuesta al tratamiento con LPS, a diferencia de los observados con el tratamiento con GW3965.

En conjunto, todos estos resultados demuestran que la activación de TLR4 por LPS incrementa de manera específica la expresión de LXR α tanto a nivel de mRNA como de proteína. Sin embargo, esos cambios observados en los niveles de expresión de LXR α no se ven traducidos en cambios en la regulación de ABCA1, uno de los genes diana clásicos de LXR.

Para determinar si los niveles de expresión de la proteína LXR α , en respuesta al LPS obedecen a una síntesis de proteína *de novo* o a una estabilización de la misma, cultivamos BMDM WT con o sin LPS, en presencia o ausencia de cicloheximida (CHX), un potente inhibidor que bloquea la síntesis activa de proteínas. Como se muestra en la **Figura 15A**, en respuesta al LPS, los niveles de expresión de la proteína LXR α se

Resultados

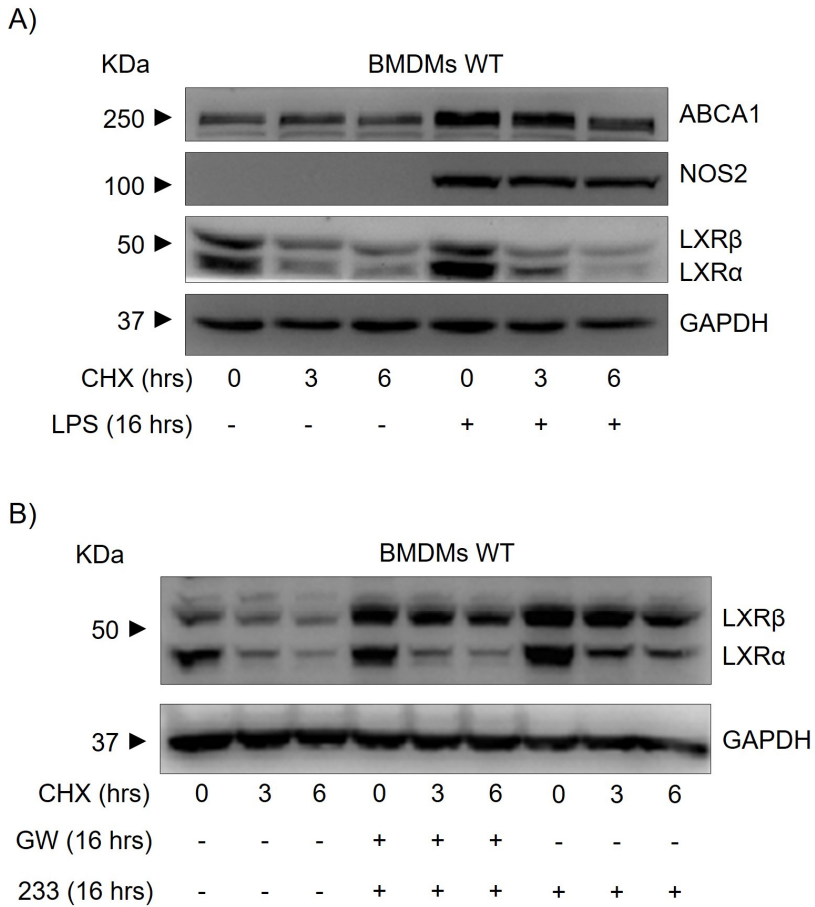


Figura 15. Estabilidad de la expresión de LXRα y LXRβ en BMDM.

Células primarias BMDMs fueron cultivadas en ausencia o presencia de LPS (100 ng/ml) (**panel A**) o GW3965 (1 μM) o GW233 (2 μM) (**panel B**) durante 22 horas y antes de finalizar el tratamiento, fueron tratadas conjuntamente con CHX (10 μg/ml) durante los tiempos establecidos. Extractos de proteínas totales fueron analizados mediante ensayos de Western blot con anticuerpos específicos. En estos ensayos se usó la GAPDH como control de carga.

mantuvieron más altos que en las células no tratadas. Sin embargo, la vida media de las proteínas endógenas LXR α y LXR β fue prácticamente similar en los controles y las células tratadas con LPS. Por el contrario, los niveles de expresión de las proteínas NOS2 y ABCA1, se mantuvieron relativamente estables a lo largo del tratamiento con CHX. Estos resultados indican, que las proteínas LXR requieren de una síntesis bastante activa para mantener sus niveles de expresión, a diferencia de otras proteínas como ABCA1 o NOS2.

Por otra parte, para determinar cómo se ven afectados los niveles expresión de las proteínas LXR, en respuesta a los tratamientos con el agonista sintético GW3965 y el antagonista GW233, tratamos BMDM WT, con agonista o antagonista, en presencia o ausencia de CHX. Sorprendentemente, los resultados de este experimento mostraron comportamientos diferentes entre las dos proteínas LXR. Mientras que, en las células control la vida media de la proteína de ambos receptores en respuesta a CHX disminuyó aproximadamente en un 80 – 90%, los tratamientos con GW3965 y GW233 mostraron diferencias muy significativas entre LXR α y LXR β . Los niveles de expresión de la proteína de LXR α en respuesta a los ligandos sintéticos se redujeron en la misma proporción que en las células control, mientras que los niveles de expresión de la proteína LXR β se mantuvieron relativamente estables en la presencia de los ligandos sintéticos. Estos datos están en consonancia con los datos publicados previamente en células humanas (Ignatova et al. 2013).

5.3. Expresión de genes diana de LXRs en respuesta al LPS.

Debido a que la expresión de ABCA1, no mostró cambios significativos tras el incremento de los niveles de proteína de LXR α en respuesta al LPS, decidimos evaluar la activación de otros genes diana de LXR. Para ello, realizamos un análisis de qPCR en BMDM WT en respuesta a LPS a distintos tiempos (0 – 48 horas). Tal y como se

Resultados

esperaba, los niveles de expresión del mRNA de *Nr1h3* se incrementaron notablemente en respuesta al LPS, alcanzando los niveles máximos de expresión a las 24 horas del tratamiento. Por el contrario, la expresión de otros genes diana (*Fads1*, *Fads2*, *Scd1* y *Scd2* o *Cd5l*) disminuyeron en el transcurso del tratamiento con LPS (**Figura 16**).

Estos hallazgos revelaron que el incremento en los niveles de expresión de LXR α en fases tardías de la respuesta inflamatoria mediada por el LPS, no se encuentran vinculados con la regulación positiva de genes diana clásicos de LXR. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que la función de LXR α en la respuesta inflamatoria inducida por LPS no se corresponde con una regulación canónica previamente conocida.

6. Caracterización de las vías de señalización intracelular que regulan la expresión de LXR α .

Para conocer mejor los eventos moleculares desencadenados durante la respuesta al LPS, que conllevan finalmente a la expresión del receptor LXR α , decidimos investigar las principales vías de señalización intracelular que son activadas en respuesta al LPS.

6.1. Análisis de la vía de señalización dependiente de NF- κ B.

En una primera aproximación, examinamos la posible implicación de la molécula adaptadora MYD88, clave en la transducción de señales de algunos receptores TLR en respuesta al LPS (Bonham et al. 2014). El análisis de qPCR en BMDM WT y MYD88 $-/-$ reveló que los niveles de expresión de *Nr1h3* no se vieron comprometidos por la deficiencia en MYD88. Sin embargo, la expresión de *I11 β* sí se vio disminuida en células BMDM MYD88 $-/-$, en comparación con células BMDM WT (**Figura 17A**). Estos resultados indican que el incremento en los niveles de expresión de LXR α en respuesta al LPS está mediada por vías de transducción de señales independientes de MYD88.

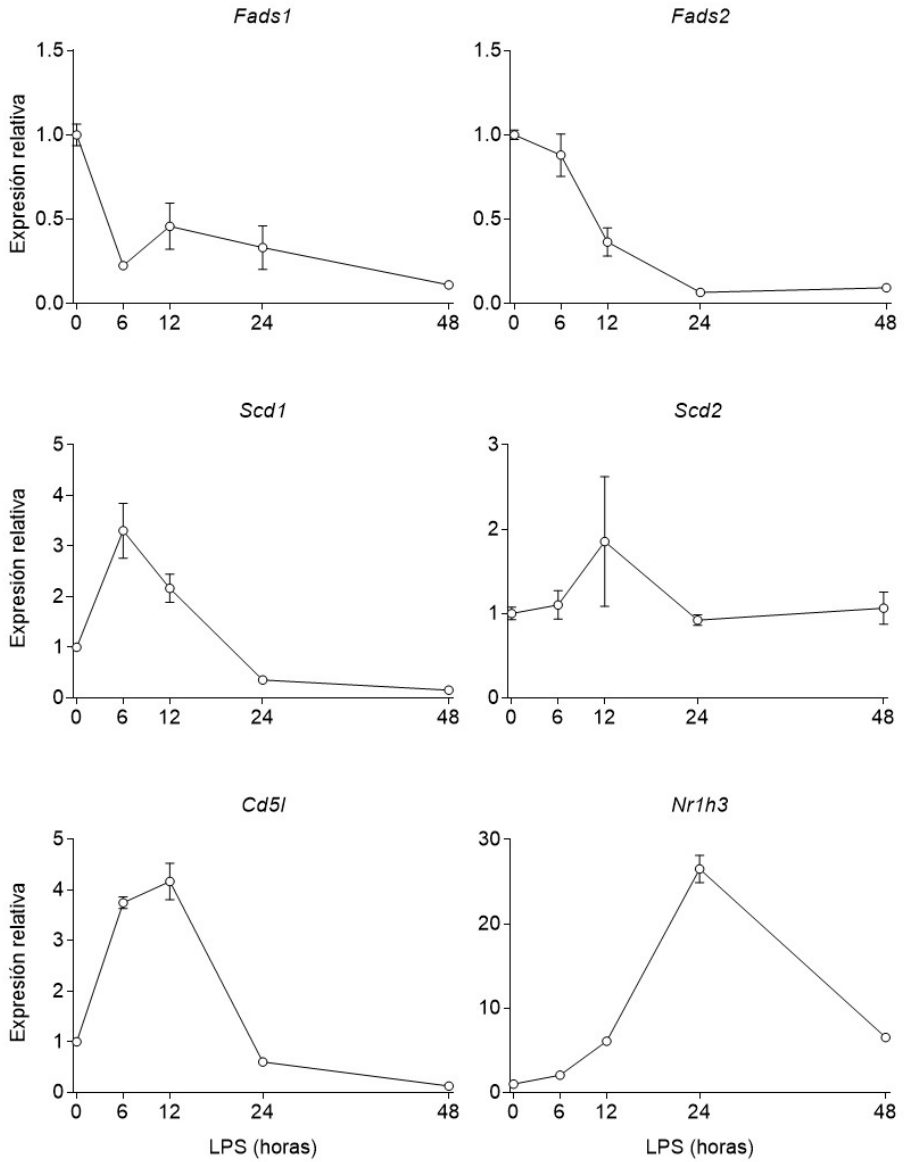


Figura 16. Expresión de genes diana de LXR en respuesta a LPS.

Células primarias BMDMs WT fueron cultivados en ausencia (Ctrl) o presencia de LPS (100 ng/ml) durante los tiempos establecidos. Los niveles de mRNA fueron analizados (previa síntesis de cDNA) mediante qPCR con cebadores específicos para cada gen.

Resultados

A continuación, con la intención de esclarecer las posibles vías de señalización que median el aumento de LXR α en respuesta a LPS, empleamos una batería de inhibidores farmacológicos de diferentes vías de transducción de señales. Los resultados de este análisis revelaron que el bloqueo de la actividad IKK β con BI605906, y de TAK1 con el inhibidor 5Z-7-oxozeanol, redujeron parcialmente los niveles de expresión de LXR α en respuesta al LPS. Sin embargo, la inhibición de MEK (PD 0325901), MAPKK (PD98059), PI3K (clorhidrato PIK-75), B-RAF (SB 590885) y RXR (HX 531) no tuvo ningún efecto sobre los niveles de expresión de LXR α (**Figura 17B**).

Este hallazgo indica que la expresión de LXR α en respuesta a la activación de TLR4 por el LPS, está regulada de manera parcial por vías que conducen a la activación de NF- κ B.

Durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria, el factor de transcripción NF- κ B puede ser activado en diferentes espacios de tiempo, por las sucesivas olas de señalización que son inducidas por citoquinas de respuesta secundaria (como TNF α o INF α/β), que son liberadas durante las fases tempranas de la respuesta inflamatoria activada por el LPS (Carswell et al. 1975; Kagan et al. 2008). Por ese motivo, decidimos explorar inicialmente la participación del TNF α endógeno en la activación tardía de NF- κ B, que podría estar implicado en la expresión de LXR α en respuesta a LPS. Para ello, comparamos los niveles de expresión del mRNA de *Nr1h3* en BMDMs WT y TNF α -/- en respuesta al LPS. El análisis de los datos de qPCR no reveló cambios en ambos genotipos, indicando que el TNF α endógeno no es importante para el incremento de los niveles de expresión de LXR α en respuesta a LPS (**Figura 17C**).

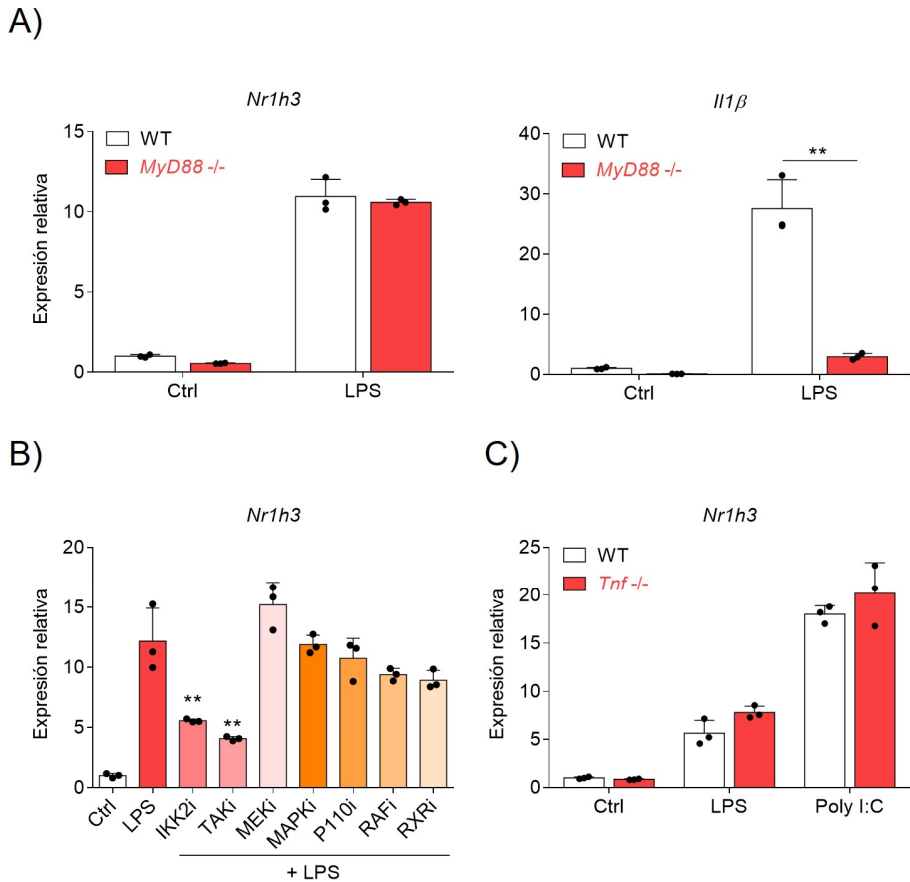


Figura 17. Análisis de la vía de señalización dependiente de NFκB.

A) Células BMDMs WT y *MyD88*^{-/-} fueron cultivados en ausencia (Ctrl) o presencia de LPS (100 ng/ml) durante 24 horas. Los niveles de mRNA fueron analizados mediante qPCR con cebadores específicos para cada gen. **p*<0.05, ***p*<0.01 con respecto a WT. **B)** Células BMDMs WT fueron cultivadas en ausencia o presencia de LPS (100 ng/ml) solo o combinado con los inhibidores BI605906 (IKK2i 1 μM), 5Z-7-oxozeanol (TAK1i 1 μM), PD0325901 MAPKK (MEKi 10 μM), PD98059 (MAPKi 10 μM), PIK-75-hidrocloruro (P110αi 2 μM), SB590885 (Raf1 1 μM), HX531 (RXRi 2 μM) durante 24 horas. Los niveles de mRNA fueron analizados mediante qPCR con cebadores específicos para cada gen. **p*<0.05, ***p*<0.01 con respecto al LPS. **C)** Células BMDMs WT y *TNFα*^{-/-} fueron cultivados en ausencia (Ctrl) o presencia de LPS (100 ng/ml) durante 24 horas. Los niveles de mRNA fueron analizados mediante qPCR con cebadores específicos para cada

Resultados

6.2. Análisis de la región promotora de *Nr1h3* (LXR α).

Para tener un conocimiento más amplio sobre los posibles TFs que podrían estar participando en el control de la expresión de LXR α en respuesta a la señalización inflamatoria, comparamos datos públicos de ChIP-seq disponibles para diferentes TFs implicados en la señalización primaria (IRF8, IRF1, IRF3, p65) y secundaria (p65 y STAT1), a diferentes tiempos de exposición al tratamiento con LPS o INF β , en las regiones promotoras de *Ifnb* (gen de expresión temprana) y *Nr1h3* (gen de expresión tardía). Los resultados del análisis de los datos de ChIP-seq (Eichenfield et al. 2016; Mancino et al. 2015; Ng et al. 2011; Tong et al. 2016; Uhlenhaut et al. 2013), revelaron la ocupación de regiones reguladoras en el promotor del *Ifnb* por TFs como IRF8, IRF1, IRF3 y p65, a tiempos relativamente cortos en respuesta al LPS. Por el contrario, el estímulo con el INF β no mostró la presencia de STAT1 en esas mismas regiones. Sin embargo, en la región promotora de *Nr1h3* se observó únicamente la presencia de NF- κ B p65 a partir de las 3 horas de tratamiento con LPS, y de STAT1 a las 6 horas después del estímulo con el INF β (**Figura 18**).

El análisis bioinformático realizado para la búsqueda de patrones de secuencias de unión para TFs, en las regiones genómicas detectadas para la unión de p65 (NF- κ B) y STAT1 en la región promotora de *Nr1h3*, mostró un enriquecimiento significativo para secuencias de motivos relacionados con estos factores de transcripción (**Figura 18**).

Todos estos hallazgos indican que los niveles de expresión de LXR α , inducidos por el tratamiento con LPS pueden estar regulados por una señalización secundaria tardía proveniente de la activación de TLR4, donde posiblemente el INF β podría tener un papel relevante.

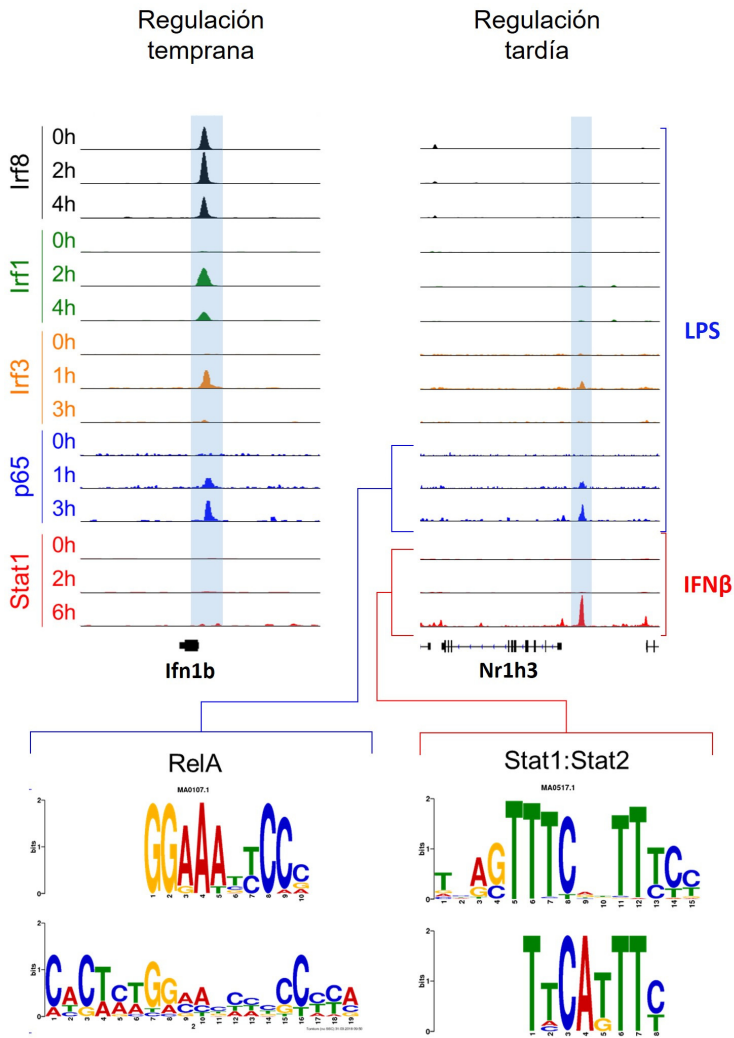


Figura 18. Análisis de la región promotora de Nr1h3 (LXRα) por ChIP-seq.

Análisis bioinformático de la ocupación genómica de IRF8, IRF1, IRF3, p65 y STAT1 en la vecindad de los genes Ifnb1 o Nr1h3, en respuesta a IFNβ o LPS respectivamente en BMDM WT, representada como densidades de lecturas de secuenciación normalizadas. Los datos fueron obtenidos a partir de la base de datos pública GEO, con números de acceso GSE67343 (Tong et al. 2016) y GSE31796 (Uhlenhaut et al. 2013) para IRF3, GSE67343 (Tong et al. 2016) y GSE72964 (Eichenfield et al. 2016) para p65, GSE33913 (Ng et al. 2011) y GSE56123 (Mancino et al. 2015) para STAT1, IRF3 e IRF8. La presencia de motivos de unión dentro de los picos detectados en la vecindad de Nr1h3 para p65 y STAT1 fue determinada mediante el empleo de matrices de motivos conocidas de la base de datos

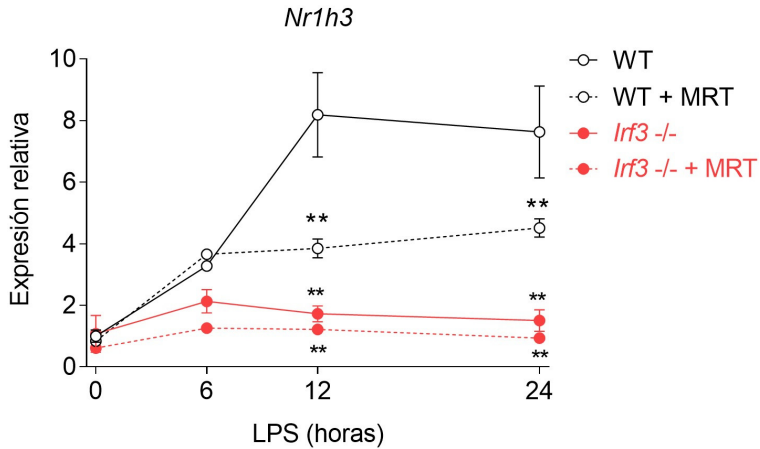
Resultados

6.3. Análisis de la vía de señalización dependiente de IRF3.

Debido a la posible participación de otros TFs diferentes a NF- κ B, en el control de los niveles de expresión de LXR α en respuesta a LPS, y dada la interrelación existente entre las vías de señalización de TLR4/TLR3, decidimos investigar la contribución aportada por diferentes TFs, mediante el uso de macrófagos knockout para varios de ellos. Primero evaluamos los niveles de expresión de LXR α en el tiempo, en respuesta al tratamiento con LPS en BMDM WT e IRF3 $-/-$. Los análisis de qPCR y WB revelaron que la expresión de LXR α muestra unos niveles significativamente reducidos en BMDM IRF3 $-/-$ en respuesta al LPS (**Figura 19A**). Por otra parte, el tratamiento previo con MRT67307, un inhibidor que previene la fosforilación de IRF3 por TBK1 (Clark et al. 2011), condujo a una reducción de los niveles de expresión de LXR α inducidos por LPS, de manera similar al patrón de expresión génica observado en el genotipo IRF3 $-/-$. Estos resultados indican una participación activa de IRF3 en la regulación de la expresión de LXR α , posiblemente a través de un mecanismo indirecto dependiente de citoquinas de señalización secundarias.

A continuación, decidimos estudiar la posible participación del INF β en la regulación de la expresión de LXR α , durante la señalización secundaria orquestada por esta citoquina. Para ello, realizamos experimentos de qPCR y WB en BMDM WT e IFNAR $-/-$ (que carecen de la cadena α del receptor de interferones tipo I), en respuesta a LPS. Este análisis reveló que los niveles de expresión de LXR α se ven severamente reducidos en macrófagos IFNAR $-/-$, en comparación con células WT. Estos resultados confirman la participación activa del INF β en la regulación de la expresión de LXR α en respuesta a LPS a través de una vía indirecta dependiente de IRF3 e INF β en la señalización inflamatoria tardía (**Figuras 20A y 20B**).

A)



B)

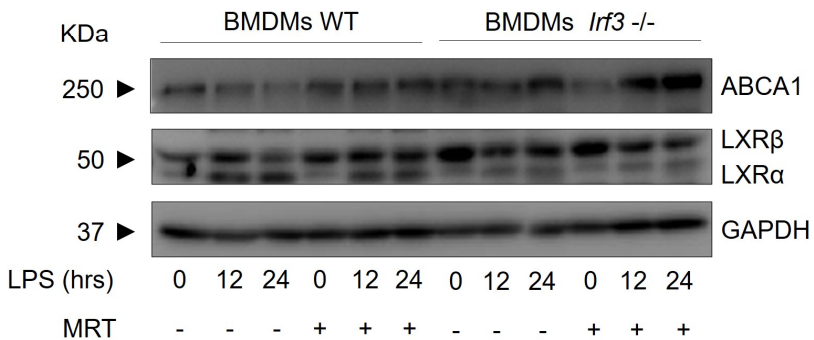
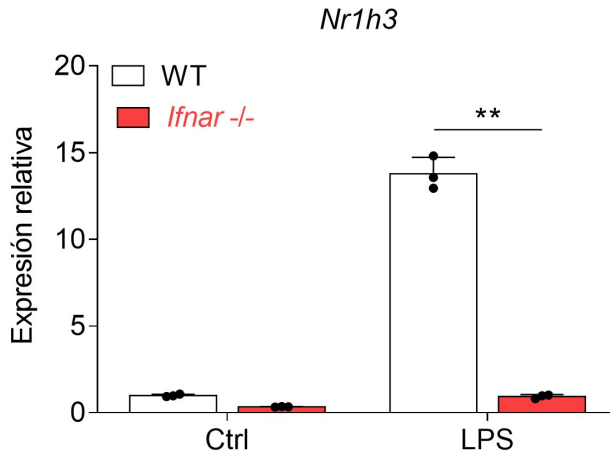


Figura 19. Análisis de la vía de señalización activada por IRF3.

A) Células primarias BMDMs WT o *IRF3* *-/-* fueron cultivadas en ausencia (Ctrl) o presencia de LPS (100 ng/ml) durante los tiempos establecidos, solo o en combinación con MRT67307, un potente inhibidor de TBK1 (2 μ M). Se analizaron los niveles de mRNA mediante qPCR con cebadores específicos para cada gen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al WT. **B)** Extractos de proteínas totales fueron analizados mediante ensayos de Western blot con anticuerpos específicos. En estos ensayos se usó la GAPDH como control de carga.

Resultados

A)



B)

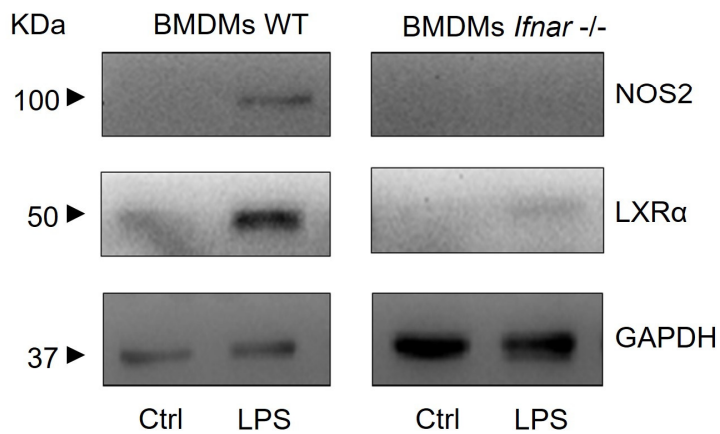


Figura 20. Análisis de la vía de señalización dependiente del INF β .

A) Células primarias BMDMs WT o IFNAR^{-/-} fueron cultivadas en ausencia (Ctrl) o presencia de LPS (100 ng/ml) durante 24 horas. Se analizaron los niveles de mRNA mediante qPCR con cebadores específicos para cada gen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al WT. **B)** Extractos de proteínas totales fueron analizados mediante ensayos de Western blot con anticuerpos específicos. En estos ensayos se usó la GAPDH como control de carga.

Para confirmar la participación adicional de otros TFs reguladores en el control de la expresión de LXR α , desarrollamos un nuevo análisis de qPCR, en el que empleamos células deficientes para los TFs (IRF3 $-/-$, IRF1 $-/-$, IFNAR $-/-$ y STAT1 $-/-$). Estos resultados confirmaron una vez más, la participación de IRF3 e IFNAR en el control de la expresión de LXR α , y por otra parte revelaron también la participación de IRF1, un TF partícipe en la regulación de la expresión del INF β , así como la participación del STAT1, un TF que es activado por los interferones tipo I (IFN α , IFN β) (**Figura 21A**).

Para evaluar de forma directa la dependencia de la producción de INF β , regulada por el eje de señalización TLR3/TLR4/TRIF/TBK1/IRF3, sobre el control de la expresión génica de LXR α , realizamos un experimento de qPCR en BMDMs WT y TRIF $-/-$ en respuesta al LPS, INF β o una combinación de ambos. Los análisis de qPCR revelaron tal y como se esperaba, que los niveles de expresión de LXR α promovidos por el tratamiento con LPS en BMDMs WT, se vieron comprometidos en células TRIF $-/-$, mientras que el tratamiento con INF β solo promovió parcialmente la expresión de LXR α en ambos tipos celulares. Sin embargo, el tratamiento combinado con LPS e INF β rescató casi por completo la expresión de LXR α en macrófagos TRIF $-/-$. Estos resultados confirman la participación directa del INF β en la señalización secundaria que regula los niveles de expresión de LXR α en las fases tardías de la respuesta al LPS (**Figura 21B**).

7. Expresión génica dependiente de LXR α en respuesta al LPS.

Para estudiar de forma más detallada el papel que desempeña la expresión de LXR α , en las fases tardías de la respuesta inflamatoria, comparamos los niveles de expresión génica global entre macrófagos BMDMs WT y LXR α $-/-$ en respuesta al tratamiento con LPS. El análisis de

Resultados

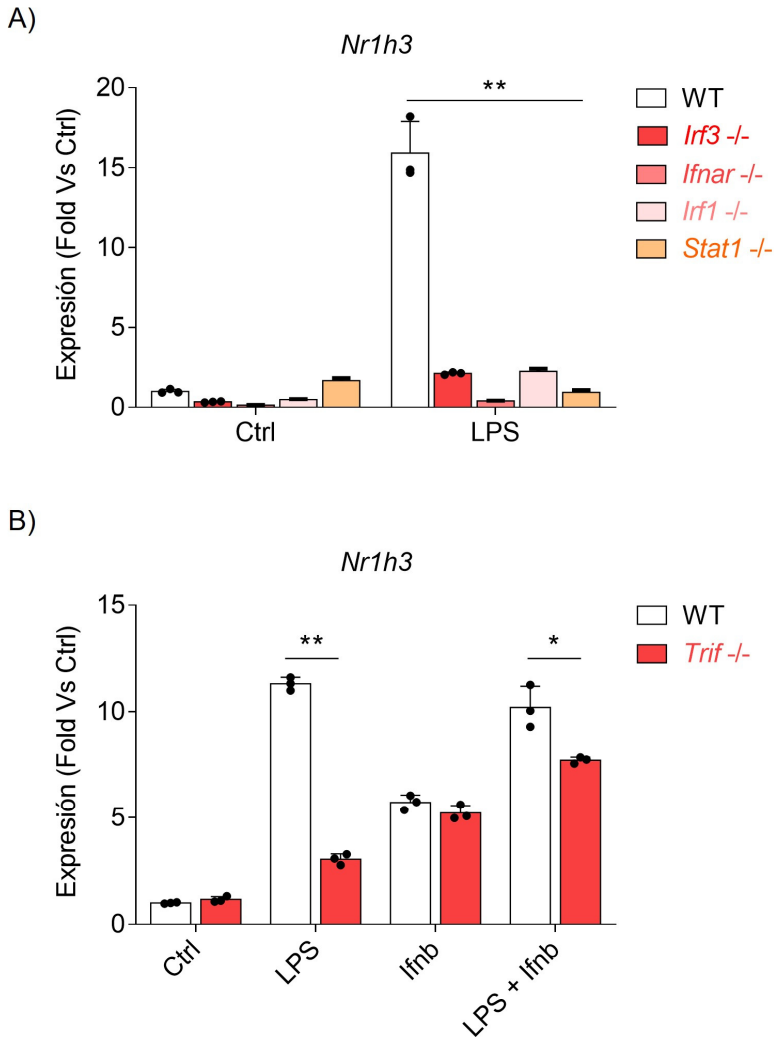


Figura 21. Análisis de los componentes que regulan la señalización activada por el $\text{INF}\beta$.

A) Células primarias BMDMs WT, *IRF3*^{-/-}, *IFNAR*^{-/-}, *IRF1*^{-/-} o *STAT1*^{-/-} fueron cultivadas en ausencia (Ctrl) o presencia de LPS (100 ng/ml) durante 24 horas. Se analizaron los niveles de mRNA mediante qPCR con cebadores específicos para cada gen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al WT. **B)** Células primarias BMDMs WT o *TRIF*^{-/-} fueron cultivadas en ausencia (Ctrl) o presencia de LPS (100 ng/ml), $\text{INF}\beta$ (500 U/ml) o una combinación de LPS + $\text{INF}\beta$ durante 24 horas. Se analizaron los niveles de mRNA mediante qPCR con cebadores

los datos reveló la existencia de diferencias significativas entre los niveles de expresión génica en células WT y LXR α -/- en respuesta al LPS. En células LXR α -/- se observa una reducción significativa (156 genes) o un incremento (170 genes) en la expresión de genes ([FC] \geq 2 y p-valor $<$ 0.05), en comparación con los genes diferencialmente expresados en el WT y en comparación con su control en respuesta a LPS (**Figura 22**).

La agrupación de genes expresados diferencialmente ([FC] \geq 2 entre genotipos) identificó principalmente dos grupos. El primero de los grupos está constituido por genes cuya expresión aumenta con el tratamiento con LPS con respecto a su control en el genotipo WT, pero que muestran una expresión significativamente comprometida en células LXR α -/- en respuesta al LPS. Por otra parte, el segundo grupo lo forman genes que muestran una expresión disminuida con el tratamiento con LPS con respecto a su control BMDMs WT, sin embargo, muestran una expresión incrementada en macrófagos LXR α -/- en respuesta al LPS (**Figura 22**). Aquellos genes que mostraron las mayores diferencias de expresión se correspondieron con citoquinas proinflamatorias (*Tnf*, *Il6*, *Il1b* e *Il1a*), y quimioquinas (*Ccl2*, *Ccl7*, *Cxcl2* y *Cxcl11*). Por otra parte, en el segundo grupo se identificaron genes de ciclinas (*Cdk1*, *Cdkn2c*, *Ccnd1*) y genes de histonas (*Hist1h2bb*, *Hist1h4c*, *Hist2h2be*) como los genes con los mayores cambios de expresión entre ambos genotipos.

El análisis bioinformático Gene Ontology, GO de los genes que conforman el primer grupo, reveló un enriquecimiento en términos relacionados con procesos inflamatorios tales como: respuesta inflamatoria, vía de señalización de NF-kappa B, respuesta al interferón-gamma, respuesta de fase aguda. Por el contrario, los genes contenidos en el segundo grupo mostraron un enriquecimiento para términos relacionados con el ciclo celular, la respuesta celular al daño del DNA entre otros (**Figura 23**).

Resultados

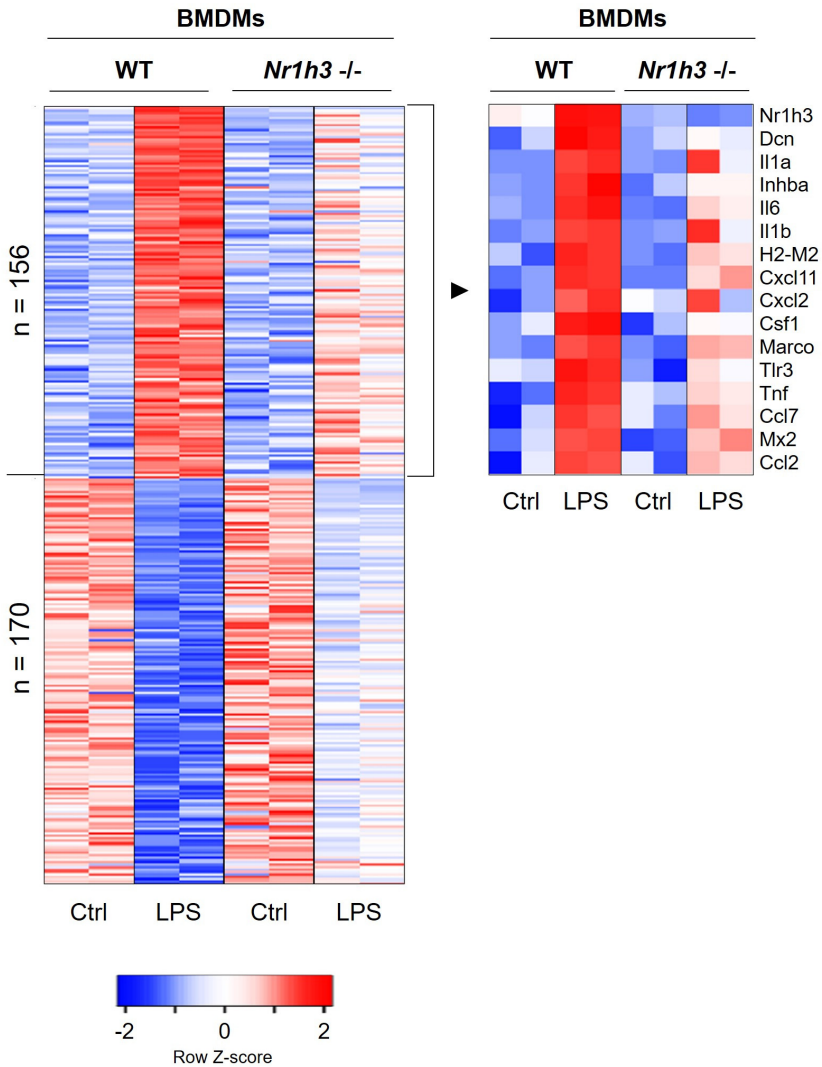


Figura 22. Expresión génica dependiente de LXR α en respuesta al LPS.

BMDM WT o LXR α ^{-/-} fueron incubados en ausencia o presencia de LPS (100 ng/ml) durante 24 horas. Los niveles de mRNA fueron analizados mediante la técnica de microarray. Los niveles de expresión de los transcritos diferencialmente expresados (FC \geq 2 y p-valor < 0.05 en WT) se representan en un mapa de calor mediante la plataforma web Heatmapper. El número de transcritos inducidos por el tratamiento con LPS se indican a la izquierda del mapa de calor.

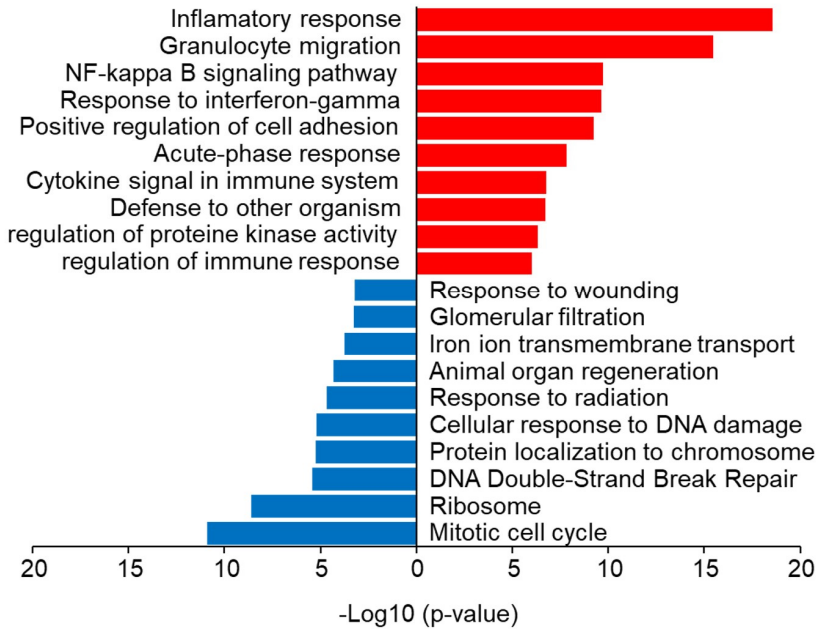


Figura 23. Funciones biológicas dependientes de la expresión de LXRα en respuesta al LPS.

Análisis bioinformático con la plataforma web Metascape (Zhou Y et al, 2019), de los Términos de ontología génica (GO) asociados a genes cuya expresión aumenta (rojo) o disminuye (azul) en respuesta al LPS en BMDM WT depende de LXRα.

Resultados

Estos datos revelan sorprendentemente que la expresión de LXR α en respuesta al LPS, es necesaria para la expresión de una batería de genes proinflamatorios en las fases tardías de la respuesta inflamatoria, que son inducidos por la activación de las vías de señalización TLR4/TLR3.

7.1. Regulación de las dianas génicas dependientes de LXR α en respuesta al LPS.

Debido a que los datos anteriores revelan un papel funcional de LXR α , sobre la regulación de la expresión de determinados genes de la respuesta inflamatoria, decidimos evaluar la contribución individual de cada uno de los receptores LXR. Para ello, comparamos los niveles de expresión de algunas de las dianas génicas detectadas anteriormente, entre BMDM LXR α $-/-$ y LXR β $-/-$. Los resultados de esta comparación confirmaron nuestros resultados previos, en los que la expresión inducida por el tratamiento con LPS de genes como *Ccl2*, *Il1 β* o *InhbA* se vio dramáticamente comprometida en células LXR α $-/-$, en comparación con las células LXR β $-/-$ (**Figura 24A**).

Por otra parte, para conocer si la regulación de la expresión de estos genes, inducidos por el LPS y dependiente de LXR α , está mediada por la acción de algún ligando endógeno natural, llevamos a cabo ensayos de qPCR en BMDM LXR β $-/-$, cultivadas a 12 y 24 horas con LPS, solo o en combinación con el agonista reverso específico de LXR (GW233) (previo al tratamiento con LPS). Inesperadamente, el análisis de qPCR reveló que el tratamiento con el inhibidor farmacológico no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de expresión inducidos por LPS, para estas dianas génicas. Estos datos sugieren que LXR α regula la expresión génica a través de un modo de acción independiente de su actividad transactivadora intrínseca (**Figura 24B**).

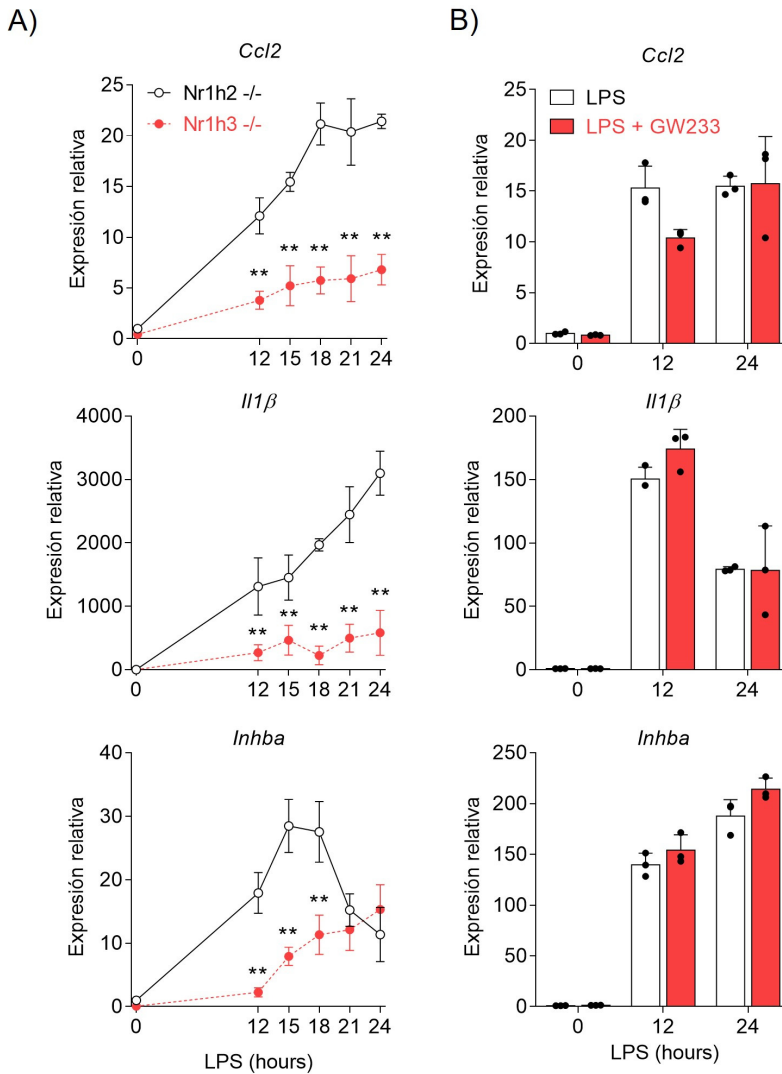


Figura 24. Expresión de dianas de LXR α en respuesta al LPS e implicación de ligandos endógenos.

A) Células BMDMs LXR α $-/-$ o LXR β $-/-$ fueron cultivadas en ausencia (Ctrl) o presencia de LPS (100 ng/ml) durante los tiempos establecidos. Se analizaron los niveles de mRNA mediante qPCR con cebadores específicos para cada gen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al Wt. **B)** Células BMDMs WT fueron cultivadas en ausencia (Ctrl) o presencia de LPS (100 ng/ml) solo o en combinación con GW233 (2 μ M) durante los tiempos establecidos. Se analizaron los niveles de mRNA mediante qPCR con cebadores específicos para cada gen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al WT.

Resultados

8. Análisis de la ocupación genómica de LXR α en respuesta al LPS.

Para evaluar si la función reguladora de LXR α desarrollada sobre estas dianas génicas, podría ser una acción directa del receptor nuclear sobre regiones reguladoras importantes para la expresión de esos genes, desarrollamos ensayos de ChIP-seq para LXR α en respuesta a LPS en células BMDM LXR α / β $-/-$ y LXR β $-/-$, y analizamos las regiones genómicas próximas a esas dianas. Los resultados obtenidos del análisis bioinformático de los datos de ChIP-seq de LXR α , revelaron una ocupación dinámica de LXR α (1594 regiones genómicas) en respuesta al LPS, muy próximas al TSS de muchos de estos genes (**Figuras 25A y 25B**).

A continuación, realizamos un análisis bioinformático para la búsqueda de repeticiones de secuencias patrón para la unión de TFs, en las regiones genómicas ubicadas bajo los sitios de ocupación del receptor LXR α en respuesta al LPS. Los resultados del análisis revelaron principalmente secuencias patrón conocidas para la unión de factores como, ETS (SpiB), bZIP (AP1), CEBP (CEBPE), ETS: IRF (PU.1: IRF8) y NR (LXRE) (**Figura 25C**). En la **Figura 25D** se ilustran algunos ejemplos de eventos de ocupación dinámica de LXR α observados en la vecindad de los genes diana de interés, regulados en respuesta al LPS.

Para determinar el tipo de regiones reguladoras en las que tiene lugar la unión de LXR α en respuesta al LPS, comparamos las distribuciones de ocupación genómica del receptor LXR α , con la presencia del factor de transcripción PU.1, y de las marcas de histonas H3K27Ac y H3K4me1, a partir de los datos de ChIP-seq publicados (Ostuni et al. 2013). Mediante

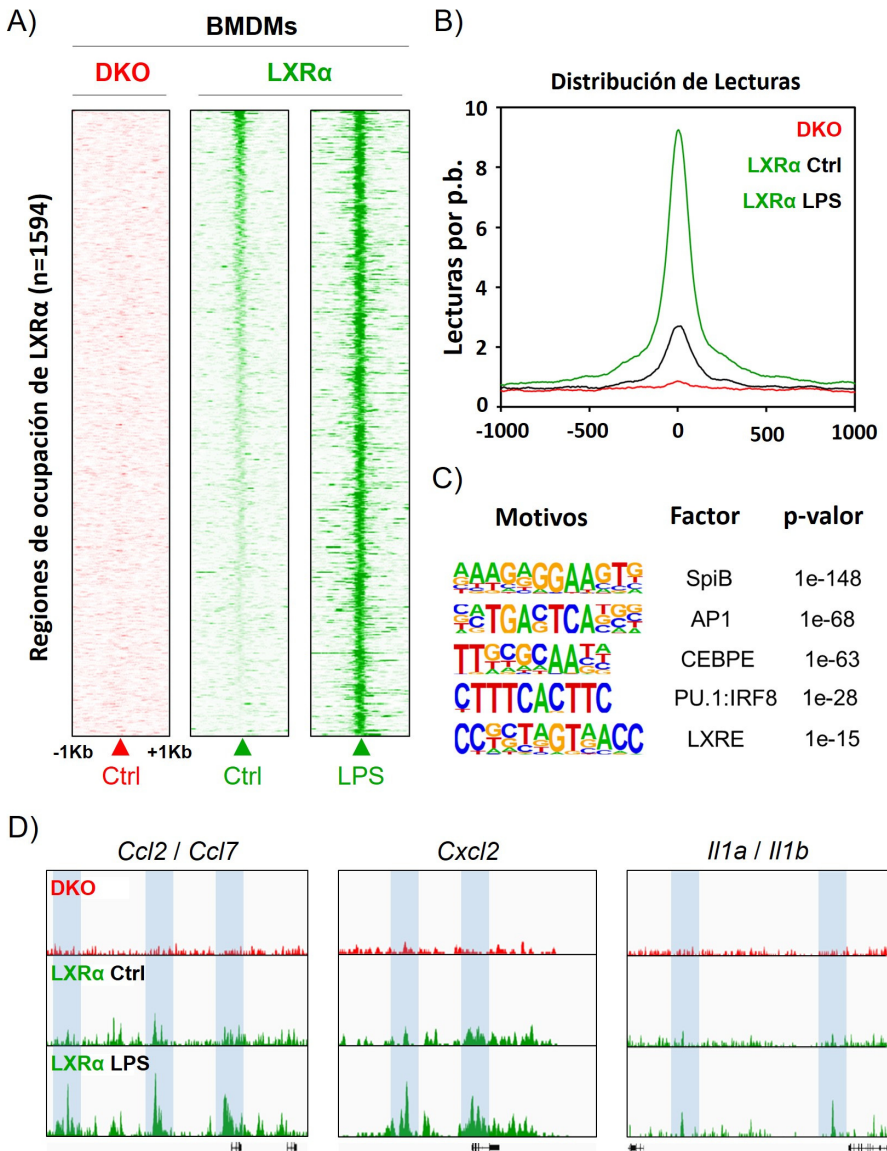


Figura 25. Análisis del ChIP-seq de LXRα en respuesta a LPS.

(A) Representación en mapa de calor de las densidades de lecturas de secuenciación de ChIP-seq (590 regiones genómicas) de LXRα en BMDMs, en una ventana de 2Kb. (B) Análisis de enriquecimiento de repeticiones de secuencias patrón conocidos, asociados a los sitios de unión de LXRα en el genoma de BMDMs en respuesta a LPS. (C) Representación de capturas del navegador genómico UCSC de los genes más representativos como ejemplo de la ocupación de LXRα en respuesta a LPS.

Resultados

este análisis, se identificaron tres tipos de regiones distintas para la marca H3K27Ac, asociadas a regiones de ocupación por LXR α en respuesta al LPS: el grupo I (190 regiones) en las que aumenta H3K27Ac (asociadas a genes transcripcionalmente activos), el grupo II (405 regiones) en las que disminuye esta marca (asociadas a genes transcripcionalmente reprimidos) y, por último, el grupo III (999 regiones) en las que H3K27Ac no cambia por el tratamiento con LPS. La presencia de PU.1 no se vio alterada por el LPS en ninguna de las regiones analizadas (**Figura 26A**), indicando que estas regiones reguladoras ya se encontraban constituidas previamente al tratamiento con LPS.

En la **Figura 26B**, se muestra un análisis de repeticiones de secuencias patrón o motivos, para cada uno de los grupos de marcas dinámicas de acetilación asociadas a regiones genómicas ocupadas por LXR α , en el que se identifica un enriquecimiento para un motivo LXRE en los grupos I y III. Muchas de las nuevas dianas génicas identificadas por la deficiencia de LXR α en respuesta al LPS se encontraron contenidas dentro de estos dos grupos.

Estos resultados también fueron comparados con datos de ChIP-seq publicados por el laboratorio del Dr. Glass para LXR α/β , p65, H3K27Ac y H3K4me1, (Oishi et al. 2017) realizados en macrófagos peritoneales, tratados durante 1 hora con Kdo2-Lipid A (KLA). En las **Figuras 27A y 27B** se muestran las regiones reguladoras próximas a *Ccl2 / Ccl7, Il1a / Il1b* y *Cxcl2* en BMDM y macrófagos peritoneales, en los que se observa el reclutamiento de LXR en respuesta tanto al tratamiento con LPS, como con KLA en las mismas regiones genómicas. También se observa el mismo patrón de unión para p65 a esas mismas regiones, así como un aumento en la marca de acetilación H3K27Ac.

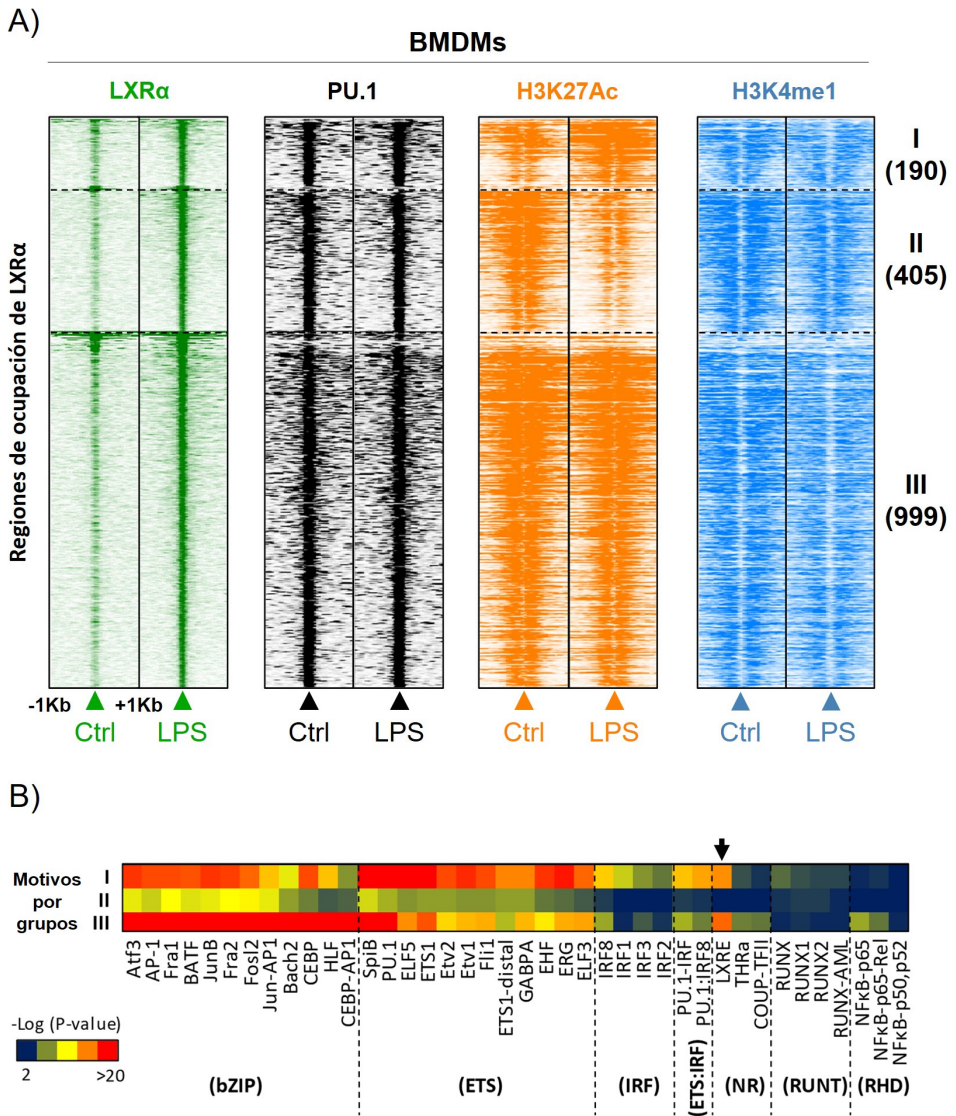


Figura 26. Análisis del ChIP-seq de LXRα, PU.1, H3K27Ac y H3K4me1 en respuesta al LPS en BMDMs.

A) Representación en mapa de calor de las densidades de lecturas de secuenciación de los ChIP-seq de LXRα, PU.1, H3K27Ac y H3K3me1 en BMDMs, en una ventana de 2Kb en respuesta al LPS. **B)** Análisis de enriquecimiento de repeticiones de secuencias patrón conocidos, correspondientes a los grupos de cambios en la marca H3K27Ac asociados a sitios de unión de LXRα en el genoma de BMDMs WT en respuesta al LPS.

Resultados

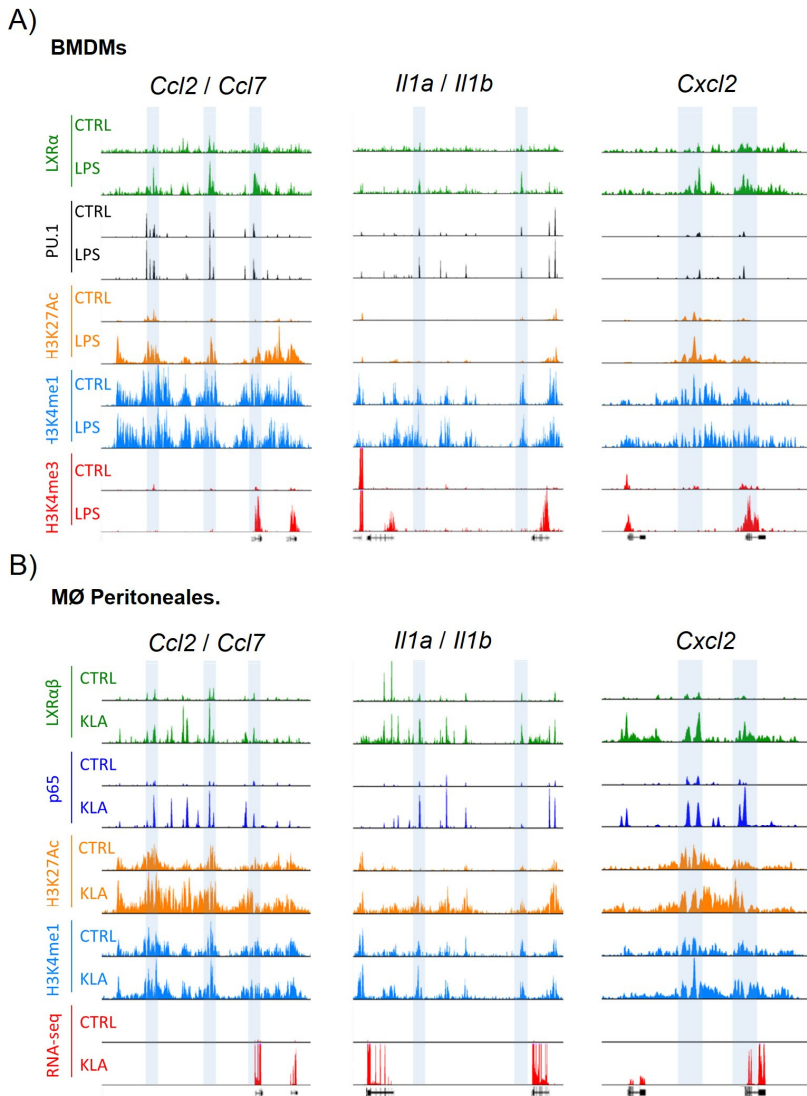


Figura 27. Análisis de regiones reguladoras en respuesta al LPS en BMDMs y macrófagos peritoneales.

A) Capturas del navegador genómico UCSC de los cambios dinámicos en la vecindad de las regiones reguladoras de los genes más representativos, en respuesta al tratamiento con LPS durante 24 horas en BMDMs. **B)** en respuesta al tratamiento con KLA durante 1 hora en macrófagos peritoneales.

Estos datos demuestran que LXR α se une a regiones genómicas reguladoras en la vecindad de algunos genes inflamatorios, en respuesta al LPS, posiblemente para ayudar a mantener una expresión sostenida en el tiempo de los genes anteriormente mencionados.

9. Estudio de LXR α en un modelo in vivo de peritonitis.

Estudios recientes han asociado algunos mediadores inflamatorios como las quimioquinas CCL2 y CCL7 en la infiltración y acumulación de neutrófilos en el espacio alveolar a través de la mediación de PAR1 (Mercer et al. 2014). Por otra parte, el TNF α y la IL1 β , son citoquinas necesarias para un correcto influjo de neutrófilos en el contexto de la artritis inducida por antígeno (Sachs et al. 2011). En el mismo contexto, la IL6 desempeña un papel crucial en el reclutamiento de leucocitos in vivo, a través de la secreción de IL8, CCL2 y moléculas de adhesión en células endoteliales, como resultado de la activación de los complejos II-6-SII-6RA (Kaplanski et al. 2003).

Según se desprende de nuestros resultados, LXR α participa en la regulación de la expresión génica en BMDMs de determinadas citoquinas y quimioquinas tales como *Il6*, *Tnf*, *Ccl2* y *Ccl7*, por lo que decidimos investigar la implicación de LXR α en un modelo de inflamación intraperitoneal in vivo en ratón, inducido por diferentes mediadores inflamatorios como el Tioglicolato, el Zymosan y el LPS.

9.1. Análisis de las poblaciones celulares in vivo en respuesta al LPS.

Durante las primeras 24 – 48 horas de la inflamación, los neutrófilos son las primeras células en acumularse en los tejidos en diferentes modelos de inflamación aguda in vivo (Gautier et al. 2013; Kaplanski et al. 2003). Por lo tanto, para conocer el comportamiento de esta población durante la inflamación, se compararon exudados peritoneales de ratones

Resultados

WT y LXR α $-/-$ mediante citometría de flujo a las 24 horas del tratamiento con diferentes mediadores inflamatorios.

Los resultados de los análisis, muestran que tras la inflamación intraperitoneal inducida por la administración de Tioglicolato, Zymosan o LPS en ratones WT, como cabía esperar, se produce una prominente infiltración dentro de la cavidad peritoneal a las 24 horas del tratamiento, de células que muestran altos niveles de los marcadores CD11b^{hi} / Ly6G^{hi}, correspondientes con neutrófilos, en comparación con el control (PBS). Sin embargo, los tratamientos con Tioglicolato y Zymosan no mostraron diferencias significativas entre los neutrófilos reclutados al peritoneo de ratones WT y LXR α $-/-$ (**Figura 28**), a diferencia del tratamiento con LPS, que mostró una reducción muy significativa en la infiltración de neutrófilos en ratones LXR α $-/-$.

Por otra parte, debido a que los macrófagos también son movilizados in vivo al lugar donde se inicia la inflamación (Gautier et al. 2013; Kaplanski et al. 2003), analizamos por citometría de flujo como podrían verse afectadas las distintas poblaciones de macrófagos peritoneales, por la ausencia de LXR α en respuesta a los diferentes mediadores inflamatorios.

Para el análisis de las poblaciones de macrófagos se utilizó una estrategia basada en el marcaje de los macrófagos totales (CD11b^{hi}/CD115^{hi}) y el posterior análisis de las poblaciones de macrófagos residentes (F4/80^{hi}/MHC-II^{lo}) y de los macrófagos inflamatorios (F4/80^{lo}/MHC-II^{hi}). Los resultados del análisis por citometría de flujo, muestran que al igual que en el caso de la población de neutrófilos, los tratamientos con el tioglicolato y el Zymosan no presentan diferencias significativas en las diferentes poblaciones de macrófagos entre ratones WT y LXR α $-/-$, sin embargo el tratamiento con LPS sí muestra una marcada reducción en las poblaciones de macrófagos residentes

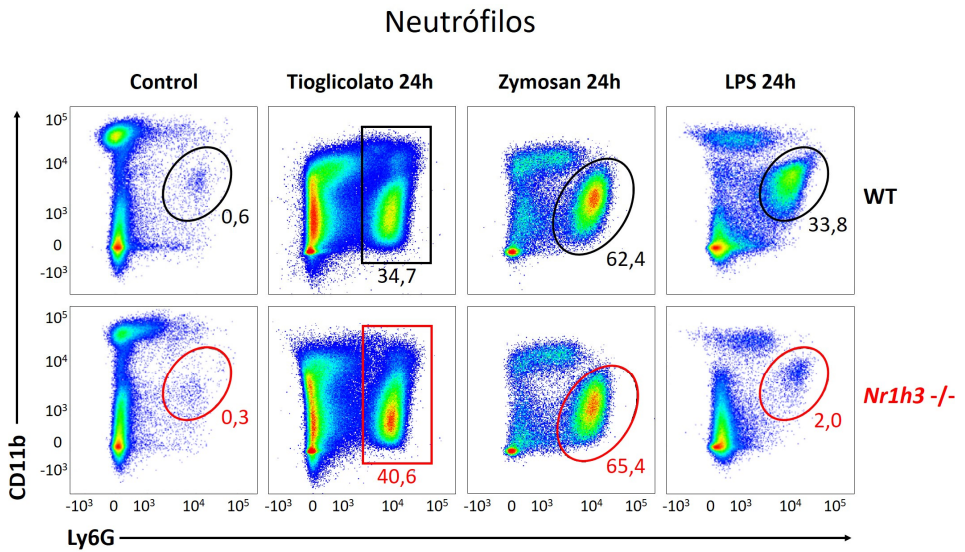


Figura 28. Análisis de la población de neutrófilos in vivo en modelo de peritonitis.

3 – 4 ratones WT y LXR α ^{-/-} fueron tratados con 2 ml de PBS, 2 ml de Tioglicolato (3%), Zymosan (40 mg/Kg) ó LPS (4 mg/Kg) mediante inyección intraperitoneal durante 24 horas. Posteriormente, se analizó por citometría de flujo la población de neutrófilos (CD11b^{hi}/Ly6G^{hi}) que fue reclutada al peritoneo para cada uno de los estímulos.

Resultados

(F4/80^{hi}/MHC-II^{lo}) y de macrófagos inflamatorios (F4/80^{lo}/MHC-II^{hi}) observándose un efecto más acusado en ratones LXR α -/- (**Figura 29**).

Estos resultados claramente indican que, LXR α desempeña un papel importante en el control de la migración de las células mieloides que son reclutadas al sitio de inicio de la respuesta inflamatoria, y que ese papel funcional es dependiente del tipo de señalización que la promueve.

El análisis cuantitativo de los resultados de la citometría de flujo de las distintas poblaciones de células mieloides en respuesta al LPS, muestra una drástica disminución en el número de neutrófilos infiltrados (CD11b^{hi}/Ly6G^{hi}) en ratones LXR α -/- con respecto al WT. Sin embargo, las diferentes poblaciones de macrófagos residentes (F4/80^{hi}/MHC-II^{lo}) e inflamatorios (F4/80^{lo}/MHC-II^{hi}) no se ven afectados por el tratamiento con el LPS cuando se comparan ratones WT y LXR -/-, aunque sí se observa una marcada reducción en el número absoluto de macrófagos totales (CD11b^{hi}/CD115^{hi}) y residentes (F4/80^{hi}/MHC-II^{lo}) con el tratamiento con LPS respecto al control, en ambos tipos de ratones (**Figura 30**).

Estos últimos resultados coinciden con lo que se conoce como la "reacción de desaparición de macrófagos" (MDR), que fue descrita por primera vez hace décadas (Nelson 1963). En esta reacción, los macrófagos peritoneales se vuelven irrecuperables de los lavados tan solo unas horas después de la introducción de estímulos inflamatorios como: la vacuna de bacilo Calmette-Guerin, o el LPS. (Barth et al. 1995; Gautier et al. 2013; Nelson 1963). La repoblación de los macrófagos residentes es lenta después de la MDR.

Conjuntamente, todos los resultados mostrados en esta memoria apuntan a que los receptores LXR, muestran una distribución genómica diferenciada entre ambas isoformas, que se relacionan con programas transcripcionales muy diferentes entre sí, en nuestro modelo celular de

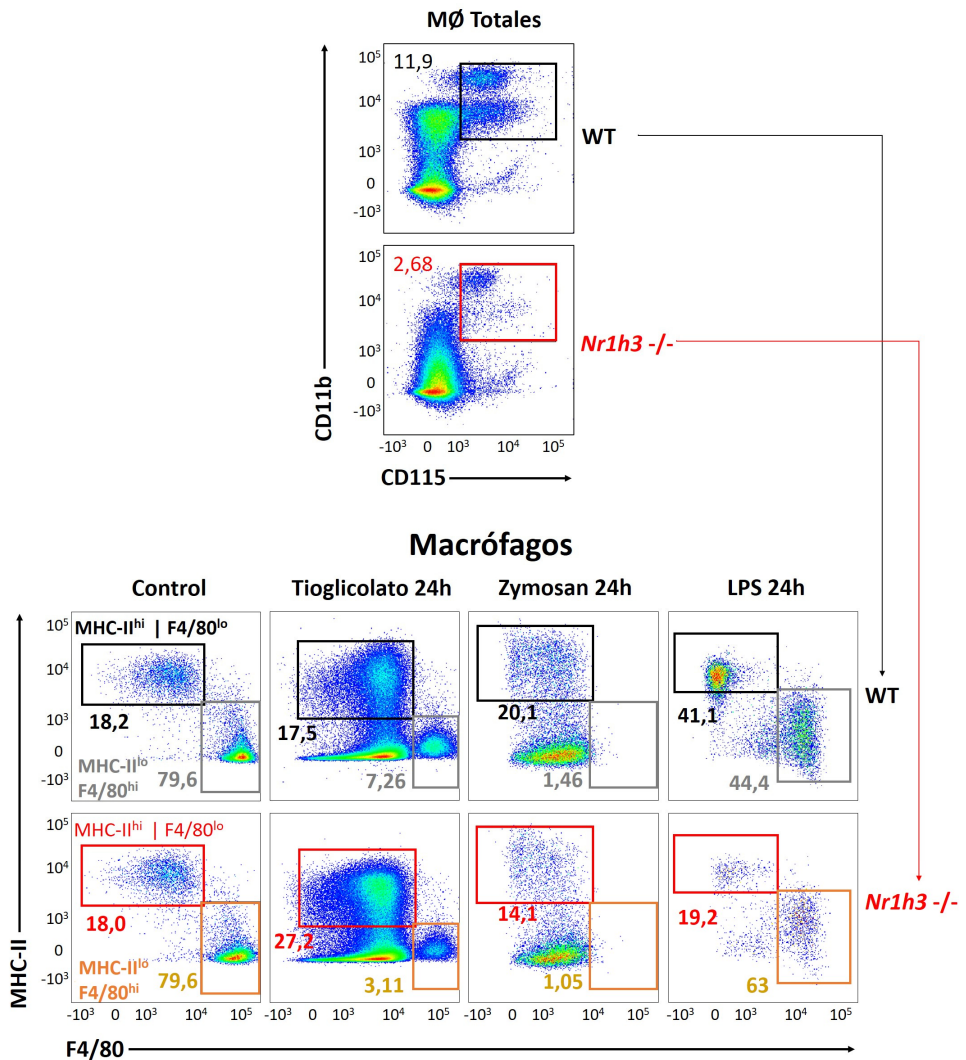


Figura 29. Análisis de la población de macrófagos in vivo en modelo de peritonitis.

3 – 4 ratones WT y LXR α ^{-/-} fueron tratados con 2 ml de PBS, 2 ml de Tioglicolato (3%), Zymosan (40 mg/Kg) o LPS (4 mg/Kg) mediante inyección intraperitoneal durante 24 horas. Posteriormente, se analizaron por citometría de flujo las diferentes poblaciones de macrófagos (Macrófagos totales CD11b^{hi}/CD115^{hi}), (Macrófagos inflamatorios MHC-II^{hi}/F4/80^{lo}) y (Macrófagos residentes MHC-II^{lo}/F4/80^{hi}), que fueron reclutados al peritoneo para cada uno de los estímulos.

Resultados

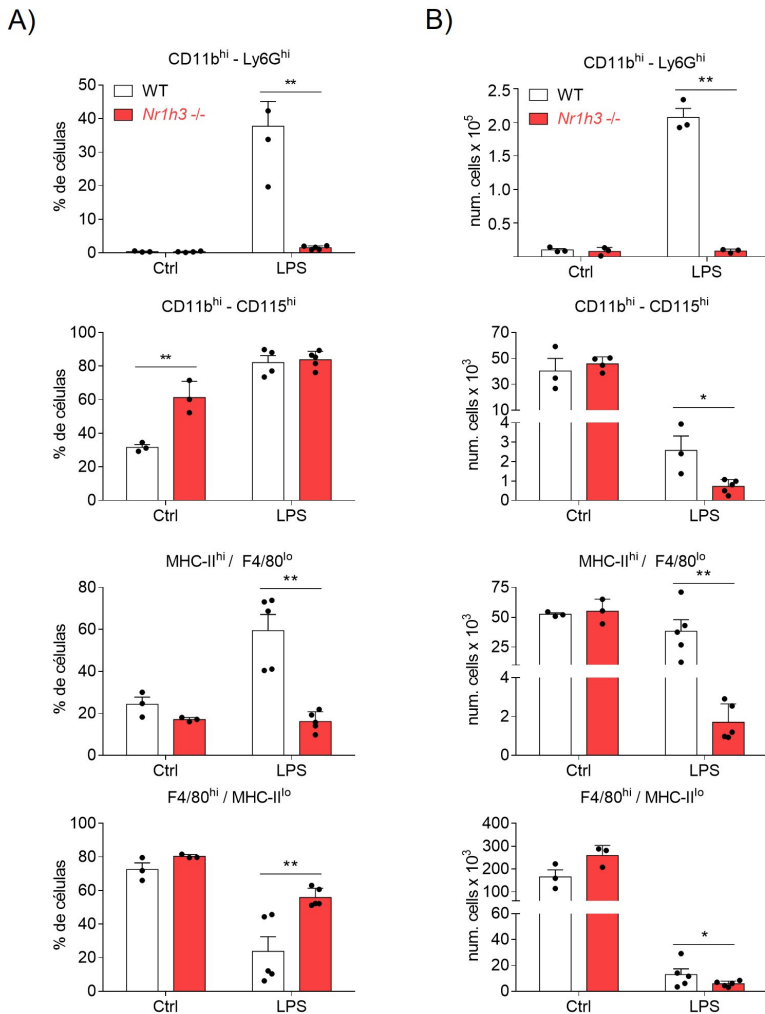


Figura 30. Análisis de la población de neutrófilos y de macrófagos en respuesta al LPS.

3 – 4 ratones WT y LXR α ^{-/-} fueron tratados con con 2 ml de PBS, 2 ml de Tioglicolato (3%), Zymosan (40 mg/Kg) o LPS (4 mg/Kg) mediante inyección intraperitoneal durante 24 horas. Posteriormente, se analizaron por citometría de flujo las poblaciones de neutrófilos (CD11b^{hi}/Ly6G^{hi}) y macrófagos (CD11b^{hi}/CD115^{hi}), (MHC-II^{hi}/F4/80^o) y (MHC-II^o/F4/80^{hi}) para cada uno de los estímulos. **A)** Representación del porcentaje de células del conteo total. **B)** Representación del número total de células para cada tipo de población estudiada. *p<0.05, **p<0.01 con respecto al WT.

iBMDM. Los datos obtenidos a partir de ese modelo celular in vitro nos han dirigido al descubrimiento de un papel funcional antimicrobiano regulado por el receptor nuclear LXR α durante la respuesta inflamatoria activada por estos microorganismos.

DISCUSIÓN

Aunque los receptores nucleares LXR, juegan un papel predominante sobre el control del metabolismo del colesterol (Lee y Tontonoz 2015), algunas publicaciones apuntan a que los receptores LXR también pueden participar en otros aspectos de la biología del macrófago, tanto en la inflamación como en la defensa del hospedador (A-González y Castrillo 2011; Schulman 2017). Por otro lado, aquellas funciones que son desempeñadas de manera más específica por cada isoforma del receptor no se han estudiado en profundidad hasta la fecha.

De manera general, la actividad de los receptores nucleares LXR se ha estudiado principalmente utilizando diferentes modelos de macrófagos primarios *in vitro* o *in vivo*, los cuales muestran claramente diferentes niveles de expresión para las proteínas LXR α y LXR β (Lavin et al. 2014; Ramón-Vázquez et al. 2019). Este hecho podría indicar que cada isoforma de LXR, pueda ejercer de manera independiente distintas funciones biológicas, dependiendo del estado de diferenciación del macrófago. Para abordar esa cuestión, en una primera aproximación, generamos un modelo celular a partir de macrófagos murinos inmortalizados, que presentan un fondo genético LXR-DKO, reconstituidos de manera independiente con cada una de las proteínas LXR que presentan tres copias de la secuencia FLAG en su extremo amino terminal. Este modelo fue inicialmente caracterizado, para demostrar su validez para estos estudios, en cuanto a los niveles de expresión, ocupación genómica y regulación transcripcional conocidas para los receptores LXR. Nuestro modelo mostró unos niveles de expresión aproximadamente similares para ambas isoformas de LXR (**Figura 2 Resultados**), unos altos niveles de ocupación en regiones genómicas de genes diana conocidos (**Figura 3 Resultados**) y reprodujo de manera adecuada la regulación transcripcional inducida en genes diana conocidos, en respuesta tanto al agonista sintético GW3965 (un potente estimulador de la actividad transcripcional de LXR), como al agonista reverso sintético GW233 (Ramón-Vázquez et al. 2019).

Discusión

Debido a la existencia de un alto grado de similitud entre las secuencias de aminoácidos de ambas isoformas de LXR, sobre todo en la región DBD (Tice et al. 2014), cabe esperar una distribución ocupacional de regiones genómicas muy similar entre LXR α y LXR β . Sin embargo, el análisis inicial mediante la técnica de ChIP-seq, reveló una distribución diferencial entre ambas isoformas de LXR, que se subdividió en tres grupos principales: un conjunto de regiones igualmente ocupadas tanto por LXR α como por LXR β y denominadas “duales”, un gran conjunto de regiones ocupadas específicamente por LXR β , y un tercer conjunto muy reducido, de regiones ocupadas específicamente por LXR α . Por lo tanto, a pesar del alto grado de similitud entre ambos receptores, solo LXR β es capaz de unirse de manera específica a un número elevado de regiones genómicas en el macrófago. Por el contrario, y a pesar de que han sido descritas en la literatura algunas acciones exclusivas vinculadas al receptor LXR α tanto *in vivo* como *in vitro* (Joseph et al. 2004; Valledor et al. 2004), éste se encuentra mayoritariamente unido a regiones genómicas ocupadas que son compartidas con el receptor nuclear LXR β (**Figura 4 Resultados**).

Para el análisis bioinformático de los datos de ChIP-seq generados en nuestro modelo de iBMDMs, se empleó una estrategia conservadora a la hora de filtrar dichos datos, para lo cual se emplearon como controles negativos de la ocupación de LXR, células LXR-DKO y DNA de partida (INPUT), además de establecerse un umbral por encima de las 40 lecturas de secuenciación, lo que permitió la discriminación de regiones de ocupación laxas o de bajo número de lecturas denominadas como regiones inespecíficas para los receptores LXR. Todo ello, junto con el hecho de que numerosos estudios anteriores fueron llevados a cabo mediante el empleo de modelos celulares que expresan niveles muy diferentes de ambas proteínas LXR y mediante el empleo de anticuerpos incapaces de discriminar entre las proteínas LXR α y LXR β (Pehkonen et al. 2012; Spann et al. 2012; Venteclef et al. 2010), hace que nuestros resultados de ChIP-

seq representen un repertorio bastante preciso de sitios de ocupación de LXR en macrófagos (Ramón-Vázquez et al. 2019).

Mediante el análisis de patrones de repetición o motivos de unión para TFs conocidos, dentro de las secuencias contenidas en las regiones ocupadas por LXR para cada uno de los grupos establecidos, se identificó una secuencia para el motivo de unión a LXR (LXRE DR-4), como la secuencia más enriquecida en todos los grupos definidos de LXR. Por otra parte, el análisis de motivos *de novo* (que busca patrones coincidentes sin tener en cuenta la degeneración o el número de ocurrencias del mismo), mostró nuevamente a COUP-TFII (motivo relacionado con NRs), para los grupos LXR α/β y LXR β o a LXRE para el grupo LXR α . Además, este análisis identificó secuencias de motivos para otros factores de transcripción acompañantes, asociados de manera selectiva a regiones genómicas ocupadas de manera específica por un receptor de LXR en particular (**Figura 5 Resultados**). Al mismo tiempo, motivos similares a C/EBP, enriquecidos en los grupos LXR α/β y LXR β , se encontraron ausentes en el grupo de regiones genómicas ocupadas por LXR α . Este último, presentó de manera específica un enriquecimiento para el motivo PBX1 (Mann y Affolter 1998). Recientemente se ha descrito que PBX1 presenta la capacidad de actuar como LDTF, uniéndose a regiones genómicas de la cromatina inaccesibles en mioblastos, para así facilitar la unión del TF MyoD y la activación de genes del linaje muscular (Berkes et al. 2004). Cabe la posibilidad, de que interacciones similares puedan tener lugar en los macrófagos. Sin embargo, para determinar si estos TFs tienen la capacidad de cooperación en la unión específica de LXR, es necesario llevar a cabo experimentos de manipulación genética sobre las secuencias de unión, o el silenciamiento de estos TFs. Por lo tanto, no es descabellado pensar que a pesar de la existencia de una secuencia canónica LXRE, presente en todos estos grupos específicos de LXR, la ocupación de estas regiones por cada receptor de LXR se lleve a cabo

Discusión

mediante su interacción con un conjunto de TFs accesorios que proporcionen un entorno accesible en estas regiones genómicas.

A demás del análisis de las regiones genómicas de ocupación por LXR, también analizamos los cambios dinámicos de acetilación sufridos en las histonas nucleosomales (H3K27Ac), en respuesta a los tratamientos farmacológicos con el agonista o antagonista, como un indicador de los posibles estados transcripcionales de activación o represión de genes diana en la vecindad de las regiones genómicas ocupadas por LXR. Sorprendentemente, estos análisis revelaron un gran número de regiones ocupadas por LXR, que mostraron cambios débiles o prácticamente nulos en la marca H3K27Ac en los tratamientos farmacológicos (**Figura 7 Resultados**). Este inesperado comportamiento podría indicar dos posibles escenarios: en el primero de ellos, la simple presencia de LXR en esas regiones genómicas podría ser importante para la adquisición de dicha modificación epigenética, que sin embargo no es capaz de promover los cambios dinámicos observados en otras regiones, en respuesta a los tratamiento farmacológicos; en el segundo escenario, la ocupación de LXR podría tener alguna función cooperadora, permitiendo la unión de otros factores de transcripción que contribuyan de manera crítica en los cambios de las marcas de acetilación y la activación transcripcional (Sven Heinz et al. 2010). Por otra parte, el análisis de secuencias enriquecidas (motivos *de novo*) de las diferentes regiones ocupadas por LXR, basándose en los cambios dinámicos de la marca de acetilación, identifiqué motivos LXRE DR4 o la mitad de un sitio LXRE, como los más enriquecidos en los diferentes grupos establecidos. En esos sitios, el motivo LXRE DR4 fue únicamente detectado en regiones que mostraron cambios en la marca de acetilación en respuesta a los tratamientos farmacológicos, mientras que la mitad de un sitio LXRE fue detectado exclusivamente en aquellas regiones en las que no se observaron cambios (**Figura 7 Resultados**). Este resultado podría apuntar a que la ocupación de LXR en estas regiones

específicas podría producirse por el reconocimiento de motivos LXRE DR4 degenerados, donde LXR podría actuar como un factor colaborativo. Si bien, esta función debería demostrarse mediante ensayos de mutagénesis genómica dirigida con CRISPR/Cas9 para estudiar estos sitios específicos de unión a LXR.

De manera complementaria, también se realizaron análisis de los niveles de expresión génica global utilizando la plataforma de microarrays de Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST. Los resultados de este estudio revelaron tres posibles mecanismos de regulación transcripcional que fueron denominados I, II y III. Cada uno de estos mecanismos de acción fue observado para los receptores LXR. El modo de acción I representa un escenario en el que, los niveles de expresión de los genes diana en células LXR-DKO, son mayores que en las iBMDM-LXR en condiciones basales, y que además los niveles de expresión aumentan con el tratamiento de GW3965. Este modo de acción ha sido ya descrito, y es conocido como el modo de “desrepresión”, ejemplificado por la diana génica por excelencia de LXR, ABCA1 (Hong y Tontonoz 2014). Por otra parte, el modo de acción II, representa un mecanismo de activación transcripcional ampliamente utilizado por estos receptores, y que ha sido caracterizado en profundidad por varios autores (Repa, Turley, et al. 2000; Wagner et al. 2003). En este modo de acción, la respuesta farmacológica se caracteriza por presentar una mayor expresión de los genes diana en los macrófagos que poseen LXR α o LXR β , en comparación con la línea LXR-DKO. Por último, nuestro estudio ha desvelado un gran número de genes que no están representados por esos dos modos anteriormente mencionados, y presumiblemente podrían obedecer a un modo de acción transcripcional distinto. En el modo III de acción, los niveles de expresión de los genes de este grupo no responden farmacológicamente al antagonista GW233 en comparación con el GW3965. Sin embargo, su expresión es significativamente mayor en las líneas que sobreexpresan ectópicamente

Discusión

LXR α o LXR β cuando son comparadas con la línea LXR-DKO (**Figuras 8, 9 y 10 Resultados**). La expresión ectópica de estos receptores, podría actuar de baliza, promoviendo el reclutamiento de otros factores de transcripción, que en última instancia sean los que regulen los niveles de expresión de un gran número de genes dianas. Sin embargo, para probar la posible implicación de otros TFs en este mecanismo de acción, se requeriría la realización de nuevos experimentos que confirmen esta hipótesis.

Nuestros análisis bioinformáticos de ontología génica sugirieron que LXR α y LXR β pueden participar en funciones biológicas específicas que van más allá del metabolismo de los ácidos grasos y los esteroides. Por ejemplo, se encontró que la regulación transcripcional llevada a cabo selectivamente por LXR α estaba vinculada principalmente a funciones como la "apoptosis", "respuesta inflamatoria" y la "migración de leucocitos" (Ramón-Vázquez et al. 2019). Curiosamente, nuestro grupo ha demostrado recientemente que los receptores LXR regulan la quimiotaxis de las células dendríticas (Beceiro et al. 2018). Sería muy interesante validar si LXR α tiene algún papel destacado sobre LXR β en la migración de los leucocitos inducida durante la respuesta inflamatoria. Por otra parte, las funciones específicas para LXR β que fueron identificadas mediante el análisis de ontología genética estaban vinculadas con la "selección de timocitos" y la "diferenciación de linfocitos". Sorprendentemente, los sitios de ocupación específicos de LXR β , se encuentran enriquecidos en secuencias repetidas que son similares a la secuencia de unión "tipo" BATF, factor de transcripción muy importante para los progenitores linfoides y la diferenciación Th (Kurachi et al. 2014; J. Wang et al. 2014). Cabe la posibilidad de que LXR β coopere con BATF en la regulación de las vías de activación de los linfocitos. Actualmente hay trabajos publicados en los que se demuestra que LXR β controla los programas génicos que

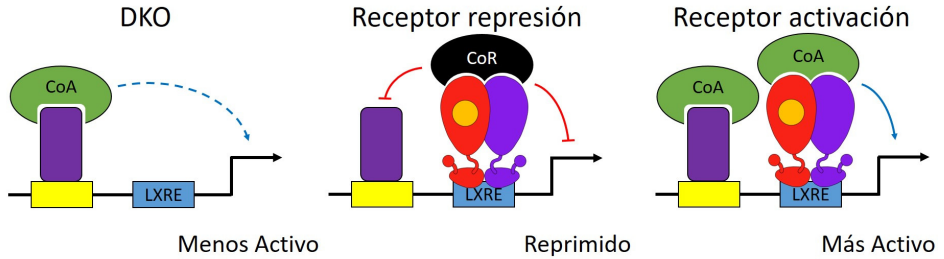
regulan la proliferación y la respuesta inmune adquirida en los linfocitos (Bensinger et al. 2008).

Estos datos proporcionan evidencias de que LXR α y LXR β pueden ocupar regiones comunes y específicas del receptor LXR en el genoma, ejerciendo el control transcripcional sobre una amplia gama de vías en los macrófagos. Cabe destacar que estos estudios resaltan la importancia de los receptores LXR en la regulación transcripcional directa de las funciones relacionadas con el sistema inmune. Además, la integración de nuestros datos de ChIP-seq y de expresión de mRNA por microarray, revelan tres modos distintos de regulación transcripcional llevada a cabo por los receptores LXR (representados como modelos en la **Figura 1**). De manera particular, es importante reconocer que la gran mayoría de los genes diana de LXR no responden al tratamiento farmacológico (modo III), por lo tanto, en el futuro será importante vincular las acciones reguladoras específicas de cada tipo de receptor LXR descubiertas aquí, a las funciones biológicas en diferentes poblaciones de macrófagos residentes en los tejidos, especialmente en el contexto de homeostasis o de enfermedad.

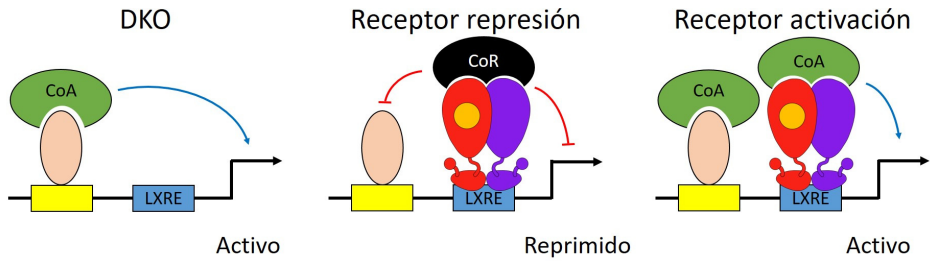
Por otra parte, el mecanismo comúnmente aceptado y publicado por el cual los receptores LXR participan en la respuesta inflamatoria es bastante controvertido, debido a que numerosos estudios indican que estos receptores desarrollan una actividad antiinflamatoria mediada por el tratamiento previo con agonistas de LXR. Los mecanismos moleculares, a través de los cuales ejercen esa actividad inflamatoria son muy diversos, entre los cuales se encuentra la transrepresión, mecanismo mediante el cual LXR se une indirectamente al complejo correpresor NCOR1 de una manera dependiente de ligando y de la modificación postraducciona de SUMOylación (Ghisletti et al. 2007; Pascual et al. 2005). Otros autores han establecido un mecanismo de acción indirecto e independiente de la SUMOylación, en el cual la función transactivadora de LXR interfiere con

Discusión

Modelo Clásico (SREBP1c)



Modelo Desrepresión (ABCA1)



Nuevo Modelo

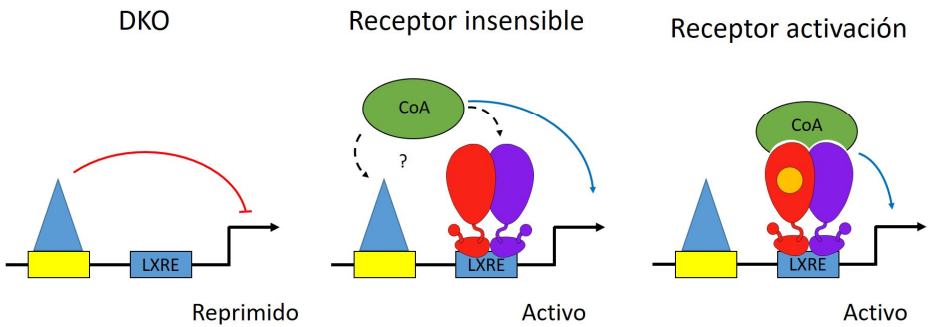


Figura 1. Representación de los mecanismos de acción de los receptores LXR.

la señalización TLR en la membrana plasmática, a través de ABCA1 (Ito et al. 2015). Recientemente, se ha propuesto un mecanismo denominado “cisrepresión”, a través del cual LXR podría suprimir la respuesta inflamatoria uniéndose de manera directa a regiones genómicas de genes inflamatorios como la *Il1β* (D. G. Thomas et al. 2018). Por el contrario, diversos estudios sobre el papel de LXR frente a las infecciones virales o bacterianas han demostrado que estos receptores desempeñan un papel muy importante para la respuesta fagocítica, que permite la eliminación y la resistencia a determinadas infecciones (Joseph et al. 2004; Matalonga et al. 2017; Ramezani et al. 2015; Valledor et al. 2004).

Parte de nuestros resultados mostrados anteriormente, indican de manera específica, que el receptor LXR α podría desempeñar un papel importante en la respuesta inflamatoria y la migración de células mieloides, por lo que decidimos estudiar en detalle el papel que desempeñan ambos receptores LXR en el macrófago en respuesta al mediador inflamatorio LPS, tanto *in vitro* como *in vivo*. Aprovechando datos de estudios previos publicados en bases de datos públicas de microarray realizados en BMDM, observamos que diversos agonistas de TLRs indujeron fuertemente los niveles de expresión del mRNA de LXR α (Ramsey et al. 2008) (**Figura 12 Resultados**). Sin embargo, dentro del listado público de transcritos regulados significativamente, no se encontró el de LXR β . Estos datos van en consonancia, con resultados publicados por otros autores (Barish et al. 2005; Joseph et al. 2004), así como por nuestros propios resultados que indican que solo los niveles de expresión de LXR α , y no de LXR β , son inducidos en respuesta al agonista de TLR4 en las fases tardías de la respuesta inflamatoria (**Figura 14 Resultados**). Por otra parte, la expresión de LXR α no se correlacionó con la regulación transcripcional de la gran mayoría de las dianas génicas de LXR como *Fads1*, *Fads2*, *Scd1*, *Scd2*, o *Cd5l* (**Figura 16 Resultados**). Estos resultados coinciden en parte

Discusión

con resultados obtenidos por otros autores en macrófagos peritoneales (Oishi et al. 2017).

Sorprendentemente, cuando estudiamos este efecto en macrófagos primarios en cultivo de distinto origen, observamos que la inducción de la expresión de LXR α , también es específica del tipo celular (**Figura 13 Resultados**). Estos resultados también van en consonancia con datos publicados por nuestro propio grupo, en los que se demuestra que únicamente los niveles de expresión basal de LXR α varían entre los distintos cultivos de macrófago primarios de diferentes orígenes, siendo los macrófagos peritoneales los que muestran los mayores niveles de expresión (Ramón-Vázquez et al. 2019). Los elevados niveles de expresión de LXR α encontrados en los macrófagos peritoneales elicitados con Tioglicolato, podrían ser inducidos a través mediadores inflamatorios, aunque se deberían realizar los experimentos necesarios, que permitan determinar cuáles de ellos podrían tener la capacidad de regular los niveles de expresión de LXR α en ese tipo celular *in vivo*. Adicionalmente, demostramos que los niveles de proteína de LXR α dependen de una biosíntesis activa de proteína (**Figura 15A Resultados**), en respuesta al LPS. Sin embargo, nuestros estudios sobre la vida media de los receptores LXR en respuesta al tratamiento con los ligandos sintéticos GW3965 y GW233, inesperadamente revelaron diferencias de estabilidad entre ambos receptores de LXR, en los que el receptor LXR α mostro una vida media mucho más corta que LXR β (**Figura 15B Resultados**). Estos resultados son similares a los resultados publicados por otros autores en macrófagos humanos con el agonista T1317, que demuestran que ese fenómeno es debido a una proteólisis del receptor LXR α por el proteasoma dependiente de ubiquitinación (Ignatova et al. 2013).

Cuando estudiamos las vías de señalización implicadas en la expresión de LXR α en BMDMs en respuesta al LPS, observamos de

manera inesperada, que la vía de señalización activada por el receptor TLR4 es completamente independiente de la molécula adaptadora MyD88 (**Figura 17A Resultados**), mientras que la activación del factor de transcripción NFκB fue requerida de manera parcial (**Figura 17B Resultados**). Este resultado, aunque sorprendente, ha sido explicado por algunos autores, que demuestran que la regulación de la expresión de la enzima Colesterol-25-hidroxilasa (*Ch25h*) en respuesta al LPS, fue independiente de la molécula adaptadora MyD88, pero a su vez dependiente de la señalización TLR4 (Diczfalusy et al. 2009). El análisis de datos de ChIP-seq públicos para diferentes TFs, reveló la presencia de p65 (NFκB) y STAT1 ubicados en la región promotora del gen *Nr1h3*, durante la fase tardía de la respuesta al LPS (**Figura 18 Resultados**). Estos resultados son a su vez consistentes, con el hecho de una interrelación existente entre las vías de señalización TLR3 y TLR4, las cuales pueden señalar de forma independiente de MyD88, y controlar la activación tardía de NFκB y la producción de IFNα/β, a través de TRAM y TRIF desde las estructuras endosomales (Yamamoto, Sato, Hemmi, Hoshino, et al. 2003; Yamamoto, Sato, Hemmi, Uematsu, et al. 2003). Esto pudo confirmarse mediante los resultados obtenidos en nuestro laboratorio a partir de experimentos de PCR y WB, realizados en ratones deficientes para la expresión de IRF3 e IFNAR, los cuales mostraron una completa dependencia de ambas proteínas para la expresión de LXRα en respuesta al LPS (**Figuras 19 y 20 Resultados**). Por otra parte, la deficiencia endógena en la citoquina TNFα no tuvo ningún efecto sobre la expresión de LXRα en respuesta al tratamiento con LPS o Poly I:C, indicando su mínima participación en las vías de señalización que regulan la expresión de LXRα. Nuestros resultados de qPCR utilizando ratones deficientes para los factores de transcripción IRF1, IRF3, STAT1 y para el receptor de membrana IFNAR1, indican inequívocamente que la expresión tardía de LXRα en BMDMs es dependiente de eje de señalización TLR4/TLR3/IRF3/IFNβ/IFNAR/STAT1/NFκB (**Figura 21A Resultados**).

Discusión

Estos resultados fueron confirmados una vez más, mediante un experimento de rescate realizado en ratones deficientes para TRIF, donde el suministro exógeno de IFN β conjuntamente con el LPS, recupera casi en su totalidad los niveles de expresión inducidos por el LPS en ratones WT (**Figura 21B Resultados**).

Para conocer en más detalle el papel de la inducción de LXR α por el LPS, se realizó el análisis de los niveles de expresión génica global, utilizando la plataforma de microarrays Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST. Los resultados derivados de ese análisis revelaron dos grupos de genes: el primer grupo incluye genes que son inducidos por el LPS en células control WT y que están reprimidos en macrófagos LXR α $-/-$, mientras que el segundo grupo abarca aquellos genes reprimidos por el LPS en células WT y que son inducidos en ausencia de LXR α $-/-$ (**Figura 22 Resultados**). Sorprendentemente, numerosos genes incluidos en el primer grupo se correspondieron con citoquinas y quimioquinas inflamatorias, implicadas en inmunidad innata, migración de granulocitos, respuesta de fase aguda y la defensa frente a otros organismos (**Figura 23 Resultados**). Cuando estudiamos la contribución individual de cada receptor LXR, en la regulación de la expresión de algunos de los genes diana que fueron detectados por el microarray, durante la fase tardía de la respuesta inflamatoria inducida por el LPS, se observó una dependencia exclusiva del receptor LXR α (**Figura 24A Resultados**).

En los últimos años, han aparecido numerosas evidencias científicas que conectan el metabolismo lipídico con la respuesta inflamatoria. Previamente se ha publicado una relación recíproca entre los niveles intracelulares de ácidos grasos antiinflamatorios y la resolución temporal de la inflamación promovida por TLR4, a través de un mecanismo que requiere la actividad de SREBP1c independiente de LXR (Oishi et al. 2017). Por otra parte, estudios recientes han demostrado que el

desmosterol, un metabolito intermediario en la vía biosintética del colesterol, es el más abundante en macrófagos cargados de lípidos y tiene la capacidad de activar los receptores LXR y suprimir a la vez la activación de SREBP (Muse et al. 2018). Otros ligandos naturales de LXR como el 25-hydroxycolesterol, pueden aumentar marcadamente sus niveles intracelulares en el macrófago, cuando éste es expuesto a mediadores inflamatorios como el LPS. Además, el tratamiento de los macrófagos con el 25-hydroxycolesterol induce la liberación de quimioquinas como CCL5, de una manera dependiente de la dosis (Diczfalusy et al. 2009). Otros autores también, han demostrado que el 25-hydroxycolesterol puede actuar como un amplificador de la inflamación, al menos en parte, mediando el reclutamiento de factores de transcripción de la familia AP-1, a un subgrupo de promotores de genes de respuesta a TLRs (Gold et al. 2014). Para investigar la posible participación de ligandos endógenos, en la regulación de algunos de los genes diana detectados en los experimentos de microarray, utilizamos una aproximación farmacológica, donde los macrófagos fueron cultivados solo con LPS o en combinación con el agonista reverso de LXR, GW233 (**Figura 24B Resultados**). Sorprendentemente, el tratamiento con el inhibidor no tuvo un efecto global significativo sobre la expresión, inducida por el LPS, de los genes diana estudiados. Estos resultados inicialmente nos indican, que LXR puede desempeñar un papel regulador independientemente de su actividad transcripcional clásica dependiente de ligando, quizás de manera semejante al mecanismo de acción III (no sensible farmacológicamente), expuesto anteriormente (Ramón-Vázquez et al. 2019). En este sentido, estudios recientes sobre AP-1 han demostrado, que las diferencias de ocupación genómica y actividad transcripcional, específicas para los diferentes monómeros de este factor de transcripción, no recae en los residuos de aminoácidos del DBD que contactan con las secuencias genómicas en el DNA, sino que se deben a interacciones específicas con TFs colaboradores, que son específicas de cada locus genómico. Por ello,

Discusión

sería posible pensar que LXR α pueda actuar en determinadas regiones genómicas como un factor de transcripción colaborador o accesorio, independiente de su capacidad transactivadora, necesario para el reclutamiento de otros factores de transcripción reguladores. Recientemente, el grupo del Dr. Glass ha demostrado que mediadores producidos por las células endoteliales sinusoidales en el hígado, inducen la expresión de LXR α y otros LDTF que reprograman el macrófago en una célula de Kupffer residente (Sakai et al. 2019).

Para determinar si LXR α ejerce un papel directo sobre las dianas génicas inflamatorias, ocupando regiones genómicas en las proximidades de estos genes, se realizaron experimentos de ChIP-seq en ratones LXR β -/- en ausencia y presencia de LPS durante 24 horas de tratamiento. Los resultados del análisis bioinformático revelaron que LXR α fue reclutado en respuesta al LPS a regiones genómicas próximas a los genes diana determinados por microarray (**Figura 25 Resultados**). Por otra parte, el análisis para la búsqueda de secuencias conservadas en esos sitios de unión, destacó principalmente secuencias de unión relacionadas con la familia del factor de transcripción maestro SpiB, y para la familia de factores de transcripción AP-1 o CEBP/E, así como para LXRE (DR4). Estos resultados fueron similares a los observados a partir de datos bioinformáticos de macrófagos peritoneales tratados con KLA durante diferentes tiempos de exposición, donde LXR fue reclutado en respuesta al LPS conjuntamente con p65 (NF κ B), y donde los niveles de acetilación en H3K27, relacionada directamente con la actividad transcripcional, incrementaron de la misma manera (Oishi et al. 2017) (**Figura 27 Resultados**).

Para investigar si una de las posibles funciones biológicas que LXR α pudiera estar desempeñando en el macrófago, recae en la regulación de la migración de células mieloides al sitio de la inflamación, utilizamos un

modelo *in vivo* de peritonitis inducida con diferentes mediadores inflamatorios. Nuestros resultados mostraron una gran deficiencia en el reclutamiento de neutrófilos a partir de los exudados obtenidos de la peritonitis inducida por el LPS, en ratones LXR α -/- cuando fueron comparados con el WT. Esta deficiencia en los niveles de neutrófilos fue específica para el estímulo inflamatorio inducido por el LPS (**Figura 28 Resultados**). Cuando se investigaron las diferentes poblaciones de macrófagos, no se observaron de manera general cambios significativos entre ratones WT y LXR α -/-, pero sí una fuerte reducción en el número de macrófagos en respuesta al LPS (**Figura 29 Resultados**), que se vio potenciada en ratones LXR α -/-. Este fenómeno ha sido descrito previamente por varios autores, en lo que se conoce como la “reacción de desaparición de macrófagos”, que tiene lugar en la respuesta inflamatoria aguda o la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado, pudiendo observarse una desaparición del 90% a las 6 horas de tratamiento (Barth et al. 1995).

En resumen, los resultados aportados en la presente tesis doctoral muestran que los receptores LXR presentan una distribución de sitios de ocupación genómicos muy diferentes entre las proteínas LXR α y LXR β , que conducen a la activación de distintos programas de expresión génica, en un modelo de macrófago inmortalizado, que expresa de manera independiente cada uno de los receptores LXR. Conjuntamente, tanto los datos de expresión génica como de ocupación genómica de LXR, muestran un nuevo mecanismo de acción que no depende de la activación del receptor por el ligando. De manera específica, los programas de expresión génica que son activados por LXR α , se encuentran ligados a funciones biológicas relacionadas con la respuesta inflamatoria y la migración de células mieloides en nuestro modelo celular. En BMDM primarias, LXR α es inducido de manera específica en respuesta a estímulos inflamatorios, a través del eje de señalización TLR4/TLR3/IRF3/IFN β /IFNAR/STAT1/NF κ B.

Discusión

La deficiencia de LXR α conduce a una expresión atenuada de varios genes inflamatorios, que son inducidos por el LPS y que están relacionados con funciones biológicas como la migración de granulocitos, respuesta de fase aguda y la defensa frente a otros organismos. LXR α es reclutado en respuesta al LPS, a sitios genómicos presentes en las proximidades de genes diana que son inducidos por el LPS, y cuya expresión se muestra atenuada en BMDMs LXR α $-/-$. La deficiencia en la expresión de LXR α provoca una disminución en el número de neutrófilos infiltrados en un modelo de peritonitis *in vivo*. Por lo tanto, este trabajo aporta numerosas evidencias experimentales que sugieren que LXR α podría desempeñar un papel importante en el macrófago frente a las infecciones microbianas y virales como se muestra en el modelo presentado (**Figura 2**).

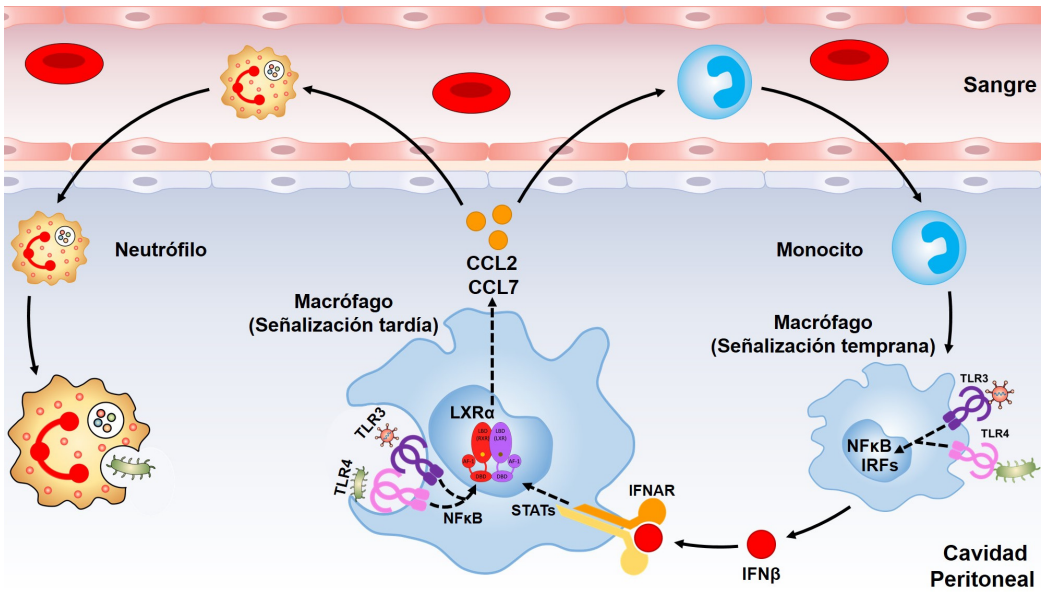


Figura 2. Representación del modelo de acción de LXR durante la respuesta inflamatoria.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Las conclusiones extraídas de los datos presentados en esta tesis doctoral son:

1. La expresión independiente de los receptores LXR en un modelo de macrófago inmortalizado iBMDM, presenta una distribución de sitios de ocupación genómicos diferente entre las proteínas LXR α y LXR β .
2. La expresión independiente de los receptores LXR α y LXR β en iBMDM, conducen a la activación de programas de expresión génica diferentes regulados por ambos receptores LXR.
3. Conjuntamente, los datos de expresión génica y de ocupación genómica de LXR muestran un mecanismo de acción novedoso, que es insensible al tratamiento farmacológico con agonistas y antagonistas de LXR.
4. El programa de expresión génica que es regulado específicamente por LXR α en un modelo de iBMDM, se encuentra ligado a funciones biológicas relacionadas con la respuesta inflamatoria y la migración de células mieloides.
5. *In vitro*, los niveles de expresión del receptor LXR α muestran una gran variación dependiendo del origen del macrófago, encontrándose la mayor expresión en macrófagos peritoneales elicitados.
6. LXR α es inducido de manera específica en respuesta a diferentes estímulos inflamatorios en BMDMs primarias. Esa expresión se encuentra regulada de manera independiente a MyD88, a través de del eje de señalización TLR4/TLR3/IRF3/IFN β /IFNAR/STAT1/NF κ B.
7. La deficiencia de LXR α conduce a una expresión génica disminuida de varias dianas inflamatorias que son inducidas por el LPS. Estos genes

Conclusiones

- se encuentran relacionados con funciones biológicas como la migración de granulocitos, la respuesta de fase aguda y la defensa frente a otros organismos.
8. LXR α es reclutado en respuesta al tratamiento con LPS, a los sitios genómicos presentes en las proximidades de dianas inflamatorias que son inducidas por el LPS y cuya expresión está atenuada en BMDM LXR α -/-.
 9. La deficiencia de LXR α conlleva a un gran déficit en el número de neutrófilos infiltrados en un modelo de peritonitis in vivo, que es dependiente de estímulo inflamatorio.

BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, Mari Luz, y W. Lee Kraus. 2004. «Transcriptional Activation by Nuclear Receptors». *Essays in Biochemistry* 40: 73-88.

A-Gonzalez, Noelia et al. 2013. «The Nuclear Receptor LXR α Controls the Functional Specialization of Splenic Macrophages». *Nature Immunology* 14(8): 831-39.

A-González, Noelia, y Antonio Castrillo. 2011. «Liver X Receptors as Regulators of Macrophage Inflammatory and Metabolic Pathways». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1812(8): 982-94.

Anbalagan, Muralidharan, Brandy Huderson, Leigh Murphy, y Brian G. Rowan. 2012. «Post-Translational Modifications of Nuclear Receptors and Human Disease». *Nuclear Receptor Signaling* 10: e001.

Apfel, R et al. 1994. «A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily.» *Molecular and Cellular Biology* 14(10): 7025-35.

Atri, Chiraz, Fatma Z. Guerfali, y Dhafer Laouini. 2018. «Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases». *International Journal of Molecular Sciences* 19(6). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6032107/> (16 de junio de 2019).

Babicki, Sasha et al. 2016. «Heatmapper: Web-Enabled Heat Mapping for All». *Nucleic Acids Research* 44(W1): W147-153.

Barish, Grant D. et al. 2005. «A Nuclear Receptor Atlas: Macrophage Activation». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 19(10): 2466-77.

———. 2010. «Bcl-6 and NF- κ B cistromes mediate opposing regulation of the innate immune response». *Genes & Development* 24(24): 2760-65.

Barozzi, Iros et al. 2014. «Coregulation of Transcription Factor Binding and Nucleosome Occupancy through DNA Features of Mammalian Enhancers». *Molecular Cell* 54(5): 844-57.

Bibliografía

- Barth, M. W., J. A. Hendrzak, M. J. Melnicoff, y P. S. Morahan. 1995. «Review of the Macrophage Disappearance Reaction». *Journal of Leukocyte Biology* 57(3): 361-67.
- Beceiro, Susana et al. 2018. «Liver X Receptor Nuclear Receptors Are Transcriptional Regulators of Dendritic Cell Chemotaxis». *Molecular and Cellular Biology* 38(10).
- Bensinger, Steven J. et al. 2008. «LXR Signaling Couples Sterol Metabolism to Proliferation in the Acquired Immune Response». *Cell* 134(1): 97-111.
- Berkes, Charlotte A. et al. 2004. «Pbx Marks Genes for Activation by MyoD Indicating a Role for a Homeodomain Protein in Establishing Myogenic Potential». *Molecular Cell* 14(4): 465-77.
- Bertrand, Julien Y. et al. 2005. «Three Pathways to Mature Macrophages in the Early Mouse Yolk Sac». *Blood* 106(9): 3004-11.
- Blanc, Mathieu et al. 2013. «The Transcription Factor STAT-1 Couples Macrophage Synthesis of 25-Hydroxycholesterol to the Interferon Antiviral Response». *Immunity* 38(1): 106-18.
- Bonham, Kevin S. et al. 2014. «A Promiscuous Lipid-Binding Protein Diversifies the Subcellular Sites of Toll-like Receptor Signal Transduction». *Cell* 156(4): 705-16.
- Bouttier, Manuella et al. 2016. «Alu repeats as transcriptional regulatory platforms in macrophage responses to M. tuberculosis infection». *Nucleic Acids Research* 44(22): 10571-87.
- Brown, Victoria et al. 2006. «Binding Specificity of Toll-like Receptor Cytoplasmic Domains». *European Journal of Immunology* 36(3): 742-53.
- Brubaker, Sky W., Kevin S. Bonham, Ivan Zanoni, y Jonathan C. Kagan. 2015. «Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective». *Annual Review of Immunology* 33: 257-90.
- Bruhn, Kevin W. et al. 2010. «LXR Deficiency Confers Increased Protection against Visceral Leishmania Infection in Mice». *PLoS neglected tropical diseases* 4(11): e886.

Brzozowski, A. M. et al. 1997. «Molecular Basis of Agonism and Antagonism in the Oestrogen Receptor». *Nature* 389(6652): 753-58.

Bulyanko, Yaroslava A., y Bert W. O'Malley. 2011. «Nuclear Receptor Coactivators: Structural and Functional Biochemistry». *Biochemistry* 50(3): 313-28.

Cao, Z. et al. 1996. «TRAF6 Is a Signal Transducer for Interleukin-1». *Nature* 383(6599): 443-46.

Carrillo, José Luis Muñoz et al. 2017. «Physiology and Pathology of Innate Immune Response Against Pathogens». *Physiology and Pathology of Immunology*. <https://www.intechopen.com/books/physiology-and-pathology-of-immunology/physiology-and-pathology-of-innate-immune-response-against-pathogens> (16 de junio de 2019).

Carswell, E.A. et al. 1975. «An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(9): 3666-70.

Casanova-Acebes, Maria, Noelia A-Gonzalez, Linnea A. Weiss, y Andres Hidalgo. 2014. «Innate Immune Cells as Homeostatic Regulators of the Hematopoietic Niche.» *International journal of hematology* 99(6): 685-94.

Castrillo, Antonio, Sean B. Joseph, Sagar A. Vaidya, et al. 2003. «Crosstalk between LXR and Toll-like Receptor Signaling Mediates Bacterial and Viral Antagonism of Cholesterol Metabolism». *Molecular Cell* 12(4): 805-16.

Castrillo, Antonio, Sean B. Joseph, Chaitra Marathe, et al. 2003. «Liver X Receptor-Dependent Repression of Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Macrophages». *The Journal of Biological Chemistry* 278(12): 10443-49.

Chan, Chun Hin et al. 2015. «BET Bromodomain Inhibition Suppresses Transcriptional Responses to Cytokine-Jak-STAT Signaling in a Gene-Specific Manner in Human Monocytes». *European Journal of Immunology* 45(1): 287-97.

Chen, Guoxun et al. 2004. «Central Role for Liver X Receptor in Insulin-Mediated Activation of Srebp-1c Transcription and Stimulation of Fatty

Bibliografía

Acid Synthesis in Liver». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(31): 11245-50.

Chen, Hanbo, y Paul C. Boutros. 2011. «VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R». *BMC Bioinformatics* 12(1): 35.

Chen, Jihong, y Qiao Li. 2011. «Life and Death of Transcriptional Co-Activator P300». *Epigenetics* 6(8): 957-61.

Chertov, O., D. Yang, O. M. Howard, y J. J. Oppenheim. 2000. «Leukocyte Granule Proteins Mobilize Innate Host Defenses and Adaptive Immune Responses». *Immunological Reviews* 177: 68-78.

Chu, Kiki, Makoto Miyazaki, Weng Chi Man, y James M. Ntambi. 2006. «Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 Deficiency Protects against Hypertriglyceridemia and Increases Plasma High-Density Lipoprotein Cholesterol Induced by Liver X Receptor Activation». *Molecular and Cellular Biology* 26(18): 6786-98.

Clark, Kristopher et al. 2011. «Novel Cross-Talk within the IKK Family Controls Innate Immunity». *The Biochemical Journal* 434(1): 93-104.

Codina, Anna et al. 2005. «Structural Insights into the Interaction and Activation of Histone Deacetylase 3 by Nuclear Receptor Corepressors». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(17): 6009-14.

Creyghton, Menno P. et al. 2010. «Histone H3K27ac Separates Active from Poised Enhancers and Predicts Developmental State». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(50): 21931-36.

Cumano, Ana, y Isabelle Godin. 2007. «Ontogeny of the Hematopoietic System». *Annual Review of Immunology* 25: 745-85.

Darimont, B. D. et al. 1998. «Structure and Specificity of Nuclear Receptor-Coactivator Interactions». *Genes & Development* 12(21): 3343-56.

Deng, L. et al. 2000. «Activation of the I κ B Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain». *Cell* 103(2): 351-61.

Deretic, Vojo, Tatsuya Saitoh, y Shizuo Akira. 2013. «Autophagy in Infection, Inflammation and Immunity». *Nature Reviews. Immunology* 13(10): 722-37.

Diczfalusy, Ulf et al. 2009. «Marked Upregulation of Cholesterol 25-Hydroxylase Expression by Lipopolysaccharide». *Journal of Lipid Research* 50(11): 2258-64.

Eckert, Jana K. et al. 2013. «The Crystal Structure of Lipopolysaccharide Binding Protein Reveals the Location of a Frequent Mutation That Impairs Innate Immunity». *Immunity* 39(4): 647-60.

Edwards, Peter A., Matthew A. Kennedy, y Puiying A. Mak. 2002. «LXRs; Oxysterol-Activated Nuclear Receptors That Regulate Genes Controlling Lipid Homeostasis». *Vascular Pharmacology* 38(4): 249-56.

Egawa, Daichi et al. 2016. «17-OxoDHA Is a PPAR α / γ Dual Covalent Modifier and Agonist». *ACS Chemical Biology* 11(9): 2447-55.

Eichenfield, Dawn Z. et al. 2016. «Tissue Damage Drives Co-Localization of NF- κ B, Smad3, and Nrf2 to Direct Rev-Erb Sensitive Wound Repair in Mouse Macrophages». *eLife* 5.

Emmerich, Christoph H. et al. 2013. «Activation of the Canonical IKK Complex by K63/M1-Linked Hybrid Ubiquitin Chains». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(38): 15247-52.

Enokizono, Yoshiaki et al. 2013. «Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(49): 19908-13.

Fenouil, Romain et al. 2012. «CpG islands and GC content dictate nucleosome depletion in a transcription-independent manner at mammalian promoters». *Genome Research* 22(12): 2399-2408.

Bibliografía

Ferrero-Miliani, L., O. H. Nielsen, P. S. Andersen, y S. E. Girardin. 2007. «Chronic Inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in Interleukin-1beta Generation». *Clinical and Experimental Immunology* 147(2): 227-35.

Fessler, Michael B. 2018. «The Challenges and Promise of Targeting the Liver X Receptors for Treatment of Inflammatory Disease». *Pharmacology & Therapeutics* 181: 1-12.

Fitzgerald, Katherine A., Sarah M. McWhirter, et al. 2003. «IKKepsilon and TBK1 Are Essential Components of the IRF3 Signaling Pathway». *Nature Immunology* 4(5): 491-96.

Fitzgerald, Katherine A., Daniel C. Rowe, et al. 2003. «LPS-TLR4 Signaling to IRF-3/7 and NF-KappaB Involves the Toll Adapters TRAM and TRIF». *The Journal of Experimental Medicine* 198(7): 1043-55.

Gadaleta, Raffaella Maria, y Luca Magnani. 2014. «Nuclear Receptors and Chromatin: An Inducible Couple». *Journal of Molecular Endocrinology* 52(2): R137-149.

Gardner, Kathryn E., C. David Allis, y Brian D. Strahl. 2011. «Operating on Chromatin, a Colorful Language Where Context Matters». *Journal of Molecular Biology* 409(1): 36-46.

Gautier, Emmanuel L., Stoyan Ivanov, Philippe Lesnik, y Gwendalyn J. Randolph. 2013. «Local Apoptosis Mediates Clearance of Macrophages from Resolving Inflammation in Mice». *Blood* 122(15): 2714-22.

Gee, A. C., y J. A. Katzenellenbogen. 2001. «Probing Conformational Changes in the Estrogen Receptor: Evidence for a Partially Unfolded Intermediate Facilitating Ligand Binding and Release». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 15(3): 421-28.

Ghisletti, Serena et al. 2007. «Parallel SUMOylation-Dependent Pathways Mediate Gene- and Signal-Specific Transrepression by LXRs and PPARgamma». *Molecular Cell* 25(1): 57-70.

———. 2009. «Cooperative NCoR/SMRT Interactions Establish a Corepressor-Based Strategy for Integration of Inflammatory and Anti-Inflammatory Signaling Pathways». *Genes & Development* 23(6): 681-93.

———. 2010. «Identification and Characterization of Enhancers Controlling the Inflammatory Gene Expression Program in Macrophages». *Immunity* 32(3): 317-28.

Gillespie, Mark A et al. 2015. «An LXR–NCOA5 gene regulatory complex directs inflammatory crosstalk-dependent repression of macrophage cholesterol efflux». *The EMBO Journal* 34(9): 1244-58.

Gilmore, Thomas D., y Steve Gerondakis. 2011. «The C-Rel Transcription Factor in Development and Disease». *Genes & Cancer* 2(7): 695-711.

Glass, C. K., y M. G. Rosenfeld. 2000. «The Coregulator Exchange in Transcriptional Functions of Nuclear Receptors». *Genes & Development* 14(2): 121-41.

Gold, Elizabeth S. et al. 2014. «25-Hydroxycholesterol Acts as an Amplifier of Inflammatory Signaling». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(29): 10666-71.

Gronemeyer, H., y D. Moras. 1995. «Nuclear Receptors. How to Finger DNA». *Nature* 375(6528): 190-91.

Gudkov, Andrei V., Katerina V. Gurova, y Elena A. Komarova. 2011. «Inflammation and P53: A Tale of Two Stresses». *Genes & Cancer* 2(4): 503-16.

Gustafsson, J. A. 1998. «Therapeutic Potential of Selective Estrogen Receptor Modulators». *Current Opinion in Chemical Biology* 2(4): 508-11.

Häcker, Hans et al. 2006. «Specificity in Toll-like Receptor Signalling through Distinct Effector Functions of TRAF3 and TRAF6». *Nature* 439(7073): 204-7.

Hashidate-Yoshida, Tomomi et al. 2015. «Fatty acid remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport». *eLife* 4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4436788/> (18 de junio de 2019).

Bibliografía

He, Yuanzheng et al. 2014. «Structures and Mechanism for the Design of Highly Potent Glucocorticoids». *Cell Research* 24(6): 713-26.

Heintzman, Nathaniel D. et al. 2007. «Distinct and Predictive Chromatin Signatures of Transcriptional Promoters and Enhancers in the Human Genome». *Nature Genetics* 39(3): 311-18.

———. 2009. «Histone Modifications at Human Enhancers Reflect Global Cell-Type-Specific Gene Expression». *Nature* 459(7243): 108-12.

Heinz, S. et al. 2013. «Effect of Natural Genetic Variation on Enhancer Selection and Function». *Nature* 503(7477): 487-92.

Heinz, Sven et al. 2010. «Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime Cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities». *Molecular Cell* 38(4): 576-89.

Heinz, Sven, Casey E. Romanoski, Christopher Benner, y Christopher K. Glass. 2015. «The Selection and Function of Cell Type-Specific Enhancers». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16(3): 144-54.

Hemmi, Hiroaki et al. 2004. «The Roles of Two I κ B Kinase-Related Kinases in Lipopolysaccharide and Double Stranded RNA Signaling and Viral Infection». *The Journal of Experimental Medicine* 199(12): 1641-50.

Hong, Cynthia et al. 2010. «The E3 Ubiquitin Ligase IDOL Induces the Degradation of the Low Density Lipoprotein Receptor Family Members VLDLR and ApoER2». *The Journal of Biological Chemistry* 285(26): 19720-26.

Hong, Cynthia, y Peter Tontonoz. 2014. «Liver X Receptors in Lipid Metabolism: Opportunities for Drug Discovery». *Nature Reviews. Drug Discovery* 13(6): 433-44.

Hornig, T., y R. Medzhitov. 2001. «Drosophila MyD88 Is an Adapter in the Toll Signaling Pathway». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(22): 12654-58.

Hu, Xiao et al. 2003. «Liver X Receptors Interact with Corepressors to Regulate Gene Expression». *Molecular Endocrinology* 17(6): 1019-26.

- Hua, X. et al. 1993. «SREBP-2, a Second Basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper Protein That Stimulates Transcription by Binding to a Sterol Regulatory Element». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(24): 11603-7.
- Huang, Pengxiang, Vikas Chandra, y Fraydoon Rastinejad. 2010. «Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics». *Annual Review of Physiology* 72: 247-72.
- Huang, Wendy et al. 2011. «Coronin 2A Mediates Actin-Dependent de-Repression of Inflammatory Response Genes». *Nature* 470(7334): 414-18.
- Hudson, William H., Christine Youn, y Eric A. Ortlund. 2013. «The Structural Basis of Direct Glucocorticoid-Mediated Transrepression». *Nature Structural & Molecular Biology* 20(1): 53-58.
- Hume, David A., Katharine M. Irvine, y Clare Pridans. 2019. «The Mononuclear Phagocyte System: The Relationship between Monocytes and Macrophages». *Trends in Immunology* 40(2): 98-112.
- Ignatova, Irena D., Jerry Angdisen, Erin Moran, y Ira G. Schulman. 2013. «Differential Regulation of Gene Expression by LXRs in Response to Macrophage Cholesterol Loading». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 27(7): 1036-47.
- Ito, Ayaka et al. 2015. «LXRs Link Metabolism to Inflammation through Abca1-Dependent Regulation of Membrane Composition and TLR Signaling». *eLife* 4: e08009.
- Iwafuchi-Doi, Makiko, y Kenneth S. Zaret. 2016. «Cell Fate Control by Pioneer Transcription Factors». *Development* 143(11): 1833-37.
- Iwasaki, Akiko, y Ruslan Medzhitov. 2015. «Control of Adaptive Immunity by the Innate Immune System». *Nature Immunology* 16(4): 343-53.
- Jain, Aakanksha, y Chandrashekhara Pasare. 2017. «Innate Control of Adaptive Immunity: Beyond the Three-Signal Paradigm». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 198(10): 3791-3800.

Bibliografía

Jakubzick, Claudia V., Gwendalyn J. Randolph, y Peter M. Henson. 2017. «Monocyte Differentiation and Antigen-Presenting Functions». *Nature Reviews. Immunology* 17(6): 349-62.

Janowski, B. A. et al. 1999. «Structural Requirements of Ligands for the Oxysterol Liver X Receptors LXRA and LXRβ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(1): 266-71.

Jeon, Y. J. et al. 2001. «Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Angelen in Murine Macrophages». *International Immunopharmacology* 1(2): 237-45.

Jeong, Kwang Won et al. 2011. «Recognition of Enhancer Element-Specific Histone Methylation by TIP60 in Transcriptional Activation». *Nature Structural & Molecular Biology* 18(12): 1358-65.

Jin, Mi Sun et al. 2007. «Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide». *Cell* 130(6): 1071-82.

Johnson, B. A. et al. 2000. «Ligand-Induced Stabilization of PPARγ Monitored by NMR Spectroscopy: Implications for Nuclear Receptor Activation». *Journal of Molecular Biology* 298(2): 187-94.

Joseph, Sean B. et al. 2002. «Direct and Indirect Mechanisms for Regulation of Fatty Acid Synthase Gene Expression by Liver X Receptors». *The Journal of Biological Chemistry* 277(13): 11019-25.

———. 2004. «LXR-Dependent Gene Expression Is Important for Macrophage Survival and the Innate Immune Response». *Cell* 119(2): 299-309.

Kagan, Jonathan C. et al. 2008. «TRAM Couples Endocytosis of Toll-like Receptor 4 to the Induction of Interferon-β». *Nature Immunology* 9(4): 361-68.

Kaikkonen, Minna U et al. 2013. «Remodeling of the enhancer landscape during macrophage activation is coupled to enhancer transcription». *Molecular cell* 51(3): 310-25.

Kallenberger, Bettina C., James D. Love, V. Krishna K. Chatterjee, y John W. R. Schwabe. 2003. «A Dynamic Mechanism of Nuclear Receptor Activation and Its Perturbation in a Human Disease». *Nature Structural Biology* 10(2): 136-40.

Kaplanski, Gilles et al. 2003. «IL-6: A Regulator of the Transition from Neutrophil to Monocyte Recruitment during Inflammation». *Trends in Immunology* 24(1): 25-29.

Kawagoe, Tatsukata et al. 2008. «Sequential Control of Toll-like Receptor-Dependent Responses by IRAK1 and IRAK2». *Nature Immunology* 9(6): 684-91.

Keidel, S., P. LeMotte, y C. Apfel. 1994. «Different Agonist- and Antagonist-Induced Conformational Changes in Retinoic Acid Receptors Analyzed by Protease Mapping». *Molecular and Cellular Biology* 14(1): 287-98.

Kennedy, Matthew A. et al. 2005. «ABCG1 Has a Critical Role in Mediating Cholesterol Efflux to HDL and Preventing Cellular Lipid Accumulation». *Cell Metabolism* 1(2): 121-31.

Khorasanizadeh, S., y F. Rastinejad. 2001. «Nuclear-Receptor Interactions on DNA-Response Elements». *Trends in Biochemical Sciences* 26(6): 384-90.

Knight, Zachary A. et al. 2006. «A Pharmacological Map of the PI3-K Family Defines a Role for p110 α in Insulin Signaling». *Cell* 125(4): 733-47.

Kobe, B., y A. V. Kajava. 2001. «The Leucine-Rich Repeat as a Protein Recognition Motif». *Current Opinion in Structural Biology* 11(6): 725-32.

Kolaczowska, Elzbieta, y Paul Kubes. 2013. «Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation». *Nature Reviews. Immunology* 13(3): 159-75.

Korf, Hannelie et al. 2009. «Liver X Receptors Contribute to the Protective Immune Response against Mycobacterium Tuberculosis in Mice». *The Journal of Clinical Investigation* 119(6): 1626-37.

Bibliografía

Kumar, Himanshu, Taro Kawai, y Shizuo Akira. 2011. «Pathogen Recognition by the Innate Immune System». *International Reviews of Immunology* 30(1): 16-34.

Kumar, Raj, y E. Brad Thompson. 2003. «Transactivation Functions of the N-Terminal Domains of Nuclear Hormone Receptors: Protein Folding and Coactivator Interactions». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 17(1): 1-10.

Kumaravelu, Parasakthy et al. 2002. «Quantitative Developmental Anatomy of Definitive Haematopoietic Stem Cells/Long-Term Repopulating Units (HSC/RUs): Role of the Aorta-Gonad-Mesonephros (AGM) Region and the Yolk Sac in Colonisation of the Mouse Embryonic Liver». *Development (Cambridge, England)* 129(21): 4891-99.

Kurachi, Makoto et al. 2014. «The Transcription Factor BATF Operates as an Essential Differentiation Checkpoint in Early Effector CD8+ T Cells». *Nature Immunology* 15(4): 373-83.

Lange, P. T., C. Schorl, D. Sahoo, y V. L. Tarakanova. 2018. «Liver X Receptors Suppress Activity of Cholesterol and Fatty Acid Synthesis Pathways To Oppose Gammaherpesvirus Replication». *mBio* 9(4): e01115-18.

Langmead, Ben, y Steven L Salzberg. 2012. «Fast gapped-read alignment with Bowtie 2». *Nature methods* 9(4): 357-59.

Lavin, Yonit et al. 2014. «Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment». *Cell* 159(6): 1312-26.

Lawrence, Toby. 2009. «The Nuclear Factor NF-KappaB Pathway in Inflammation». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1(6): a001651.

Lee, Stephen D., y Peter Tontonoz. 2015. «Liver X Receptors at the Intersection of Lipid Metabolism and Atherogenesis». *Atherosclerosis* 242(1): 29-36.

Lefstin, J. A., y K. R. Yamamoto. 1998. «Allosteric Effects of DNA on Transcriptional Regulators». *Nature* 392(6679): 885-88.

- Leopold Wager, Chrissy M., Eusondia Arnett, y Larry S. Schlesinger. 2019. «Mycobacterium Tuberculosis and Macrophage Nuclear Receptors: What We Do and Don't Know». *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*.
- Li, Pingping et al. 2013. «NCoR Repression of LXRs Restricts Macrophage Biosynthesis of Insulin-Sensitizing Omega 3 Fatty Acids». *Cell* 155(1): 200-214.
- Li, Yong, Millard H. Lambert, y H. Eric Xu. 2003. «Activation of Nuclear Receptors: A Perspective from Structural Genomics». *Structure (London, England: 1993)* 11(7): 741-46.
- Libby, Peter. 2007. «Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease». *Nutrition Reviews* 65(s3): S140-46.
- Lidor Nili, Efrat et al. 2010. «p53 binds preferentially to genomic regions with high DNA-encoded nucleosome occupancy». *Genome Research* 20(10): 1361-68.
- Lin, Su-Chang, Yu-Chih Lo, y Hao Wu. 2010. «Helical Assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 Complex in TLR/IL-1R Signalling». *Nature* 465(7300): 885-90.
- Little, Tanya H. et al. 2006. «Sequence-Specific Deoxyribonucleic Acid (DNA) Recognition by Steroidogenic Factor 1: A Helix at the Carboxy Terminus of the DNA Binding Domain Is Necessary for Complex Stability». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 20(4): 831-43.
- Liu, Lin et al. 2008. «Structural Basis of Toll-like Receptor 3 Signaling with Double-Stranded RNA». *Science (New York, N.Y.)* 320(5874): 379-81.
- Liu, Su-Yang et al. 2013. «Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Broadly Inhibits Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol». *Immunity* 38(1): 92-105.
- Lonard, David M., y Bert W. O'malley. 2007. «Nuclear Receptor Coregulators: Judges, Juries, and Executioners of Cellular Regulation». *Molecular Cell* 27(5): 691-700.

Bibliografía

Long, Matthew E. et al. 2017. «MEK1/2 Inhibition Promotes Macrophage Reparative Properties». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 198(2): 862-72.

Luisi, B. F. et al. 1991. «Crystallographic Analysis of the Interaction of the Glucocorticoid Receptor with DNA». *Nature* 352(6335): 497-505.

Mahajan, Sahil et al. 2012. «Mycobacterium Tuberculosis Modulates Macrophage Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPAR γ and TR4 for Survival». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188(11): 5593-5603.

Mak, Puiying A. et al. 2002. «Regulated Expression of the Apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II Gene Cluster in Murine and Human Macrophages. A Critical Role for Nuclear Liver X Receptors Alpha and Beta». *The Journal of Biological Chemistry* 277(35): 31900-908.

Mancino, Alessandra et al. 2015. «A Dual Cis-Regulatory Code Links IRF8 to Constitutive and Inducible Gene Expression in Macrophages». *Genes & Development* 29(4): 394-408.

Mann, R. S., y M. Affolter. 1998. «Hox Proteins Meet More Partners». *Current Opinion in Genetics & Development* 8(4): 423-29.

Matalonga, Jonathan et al. 2017. «The Nuclear Receptor LXR Limits Bacterial Infection of Host Macrophages through a Mechanism That Impacts Cellular NAD Metabolism». *Cell Reports* 18(5): 1241-55.

Mayadas, Tanya N., Xavier Cullere, y Clifford A. Lowell. 2014. «The Multifaceted Functions of Neutrophils». *Annual Review of Pathology* 9: 181-218.

McGrath, Kathleen E., Anne D. Koniski, Jeffrey Malik, y James Palis. 2003. «Circulation Is Established in a Stepwise Pattern in the Mammalian Embryo». *Blood* 101(5): 1669-76.

McKenna, N. J., R. B. Lanz, y B. W. O'Malley. 1999. «Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology». *Endocrine Reviews* 20(3): 321-44.

McWhirter, Sarah M. et al. 2004. «IFN-Regulatory Factor 3-Dependent Gene Expression Is Defective in Tbk1-Deficient Mouse Embryonic Fibroblasts». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(1): 233-38.

Medzhitov, Ruslan. 2009. «Approaching the Asymptote: 20 Years Later». *Immunity* 30(6): 766-75.

———. 2010. «Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame». *Cell* 140(6): 771-76.

Meijsing, Sebastiaan H. et al. 2009. «DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity». *Science (New York, N.Y.)* 324(5925): 407-10.

Mercer, Paul F. et al. 2014. «Proteinase-Activated Receptor-1, CCL2, and CCL7 Regulate Acute Neutrophilic Lung Inflammation». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 50(1): 144-57.

Mi, Li-Zhi et al. 2003. «Structural Basis for Bile Acid Binding and Activation of the Nuclear Receptor FXR». *Molecular Cell* 11(4): 1093-1100.

Millard, Christopher J., Peter J. Watson, Louise Fairall, y John W. R. Schwabe. 2013. «An Evolving Understanding of Nuclear Receptor Coregulator Proteins». *Journal of Molecular Endocrinology* 51(3): T23-36.

Moras, D., y H. Gronemeyer. 1998. «The Nuclear Receptor Ligand-Binding Domain: Structure and Function». *Current Opinion in Cell Biology* 10(3): 384-91.

Motshwene, Precious G. et al. 2009. «An Oligomeric Signaling Platform Formed by the Toll-like Receptor Signal Transducers MyD88 and IRAK-4». *The Journal of Biological Chemistry* 284(37): 25404-11.

Mujawar, Zahedi et al. 2006. «Human Immunodeficiency Virus Impairs Reverse Cholesterol Transport from Macrophages». *PLoS biology* 4(11): e365.

Bibliografía

Murray, Peter J., y Thomas A. Wynn. 2011. «Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets». *Nature Reviews. Immunology* 11(11): 723-37.

Muse, Evan D. et al. 2018. «Cell-Specific Discrimination of Desmosterol and Desmosterol Mimetics Confers Selective Regulation of LXR and SREBP in Macrophages». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(20): E4680-89.

Muzio, M., J. Ni, P. Feng, y V. M. Dixit. 1997. «IRAK (Pelle) Family Member IRAK-2 and MyD88 as Proximal Mediators of IL-1 Signaling». *Science (New York, N.Y.)* 278(5343): 1612-15.

Nagy, Laszlo, y John W. R. Schwabe. 2004. «Mechanism of the Nuclear Receptor Molecular Switch». *Trends in Biochemical Sciences* 29(6): 317-24.

Natoli, Gioacchino. 2010. «Maintaining Cell Identity through Global Control of Genomic Organization». *Immunity* 33(1): 12-24.

Natoli, Gioacchino, Serena Ghisletti, y Iros Barozzi. 2011. «The Genomic Landscapes of Inflammation». *Genes & Development* 25(2): 101-6.

Natrajan, Muktha S. et al. 2015. «Retinoid X Receptor Activation Reverses Age-Related Deficiencies in Myelin Debris Phagocytosis and Remyelination». *Brain: A Journal of Neurology* 138(Pt 12): 3581-97.

Nelson, D. S. 1963. «Reaction to Antigens in Vivo of the Peritoneal Macrophages of Guinea-Pigs with Delayed Type Hypersensitivity. Effects of Anticoagulants and Other Drugs». *Lancet (London, England)* 2(7300): 175-76.

Ng, Sze-Ling et al. 2011. «I κ B Kinase Epsilon (IKK(Epsilon)) Regulates the Balance between Type I and Type II Interferon Responses». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(52): 21170-75.

Nicodeme, Edwige et al. 2010. «Suppression of Inflammation by a Synthetic Histone Mimic». *Nature* 468(7327): 1119-23.

Ninomiya-Tsuji, Jun et al. 2003. «A Resorcylic Acid Lactone, 5Z-7-Oxozeaenol, Prevents Inflammation by Inhibiting the Catalytic Activity of TAK1 MAPK Kinase Kinase». *The Journal of Biological Chemistry* 278(20): 18485-90.

Nolte, R. T. et al. 1998. «Ligand Binding and Co-Activator Assembly of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma». *Nature* 395(6698): 137-43.

Nowak, David E., Bing Tian, y Allan R. Brasier. 2005. «Two-Step Cross-Linking Method for Identification of NF-KappaB Gene Network by Chromatin Immunoprecipitation». *BioTechniques* 39(5): 715-25.

Oishi, Yumiko et al. 2017. «SREBP1 Contributes to Resolution of Pro-Inflammatory TLR4 Signaling by Reprogramming Fatty Acid Metabolism». *Cell Metabolism* 25(2): 412-27.

Okabe, Yasutaka, y Ruslan Medzhitov. 2014. «Tissue-Specific Signals Control Reversible Program of Localization and Functional Polarization of Macrophages». *Cell* 157(4): 832-44.

Orkin, Stuart H., y Leonard I. Zon. 2008. «Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology». *Cell* 132(4): 631-44.

Ostuni, Renato et al. 2013. «Latent Enhancers Activated by Stimulation in Differentiated Cells». *Cell* 152(1-2): 157-71.

Ozinsky, A. et al. 2000. «The Repertoire for Pattern Recognition of Pathogens by the Innate Immune System Is Defined by Cooperation between Toll-like Receptors». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(25): 13766-71.

Palis, J. et al. 1999. «Development of Erythroid and Myeloid Progenitors in the Yolk Sac and Embryo Proper of the Mouse». *Development (Cambridge, England)* 126(22): 5073-84.

Palis, J., y M. C. Yoder. 2001. «Yolk-Sac Hematopoiesis: The First Blood Cells of Mouse and Man». *Experimental Hematology* 29(8): 927-36.

Bibliografía

Palm, Noah W., y Ruslan Medzhitov. 2009. «Pattern Recognition Receptors and Control of Adaptive Immunity». *Immunological Reviews* 227(1): 221-33.

Park, Beom Seok et al. 2009. «The Structural Basis of Lipopolysaccharide Recognition by the TLR4-MD-2 Complex». *Nature* 458(7242): 1191-95.

Pascual, Gabriel et al. 2005. «A SUMOylation-Dependent Pathway Mediates Transrepression of Inflammatory Response Genes by PPAR-Gamma». *Nature* 437(7059): 759-63.

Pawlak, Michal, Philippe Lefebvre, y Bart Staels. 2012. «General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 12(6): 486-504.

Pehkonen, Petri et al. 2012. «Genome-Wide Landscape of Liver X Receptor Chromatin Binding and Gene Regulation in Human Macrophages». *BMC genomics* 13: 50.

Piao, Wenji et al. 2013. «Recruitment of TLR adapter TRIF to TLR4 signaling complex is mediated by the second helical region of TRIF TIR domain». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(47): 19036-41.

Pissios, P., I. Tzameli, P. Kushner, y D. D. Moore. 2000. «Dynamic Stabilization of Nuclear Receptor Ligand Binding Domains by Hormone or Corepressor Binding». *Molecular Cell* 6(2): 245-53.

Pradel, Lydie C. et al. 2009. «ATP-Binding Cassette Transporter Hallmarks Tissue Macrophages and Modulates Cytokine-Triggered Polarization Programs». *European Journal of Immunology* 39(8): 2270-80.

Qiao, Huan, y James M. May. 2009. «Macrophage differentiation increases expression of the ascorbate transporter (SVCT2)». *Free radical biology & medicine* 46(8): 1221-32.

Rada-Iglesias, Alvaro et al. 2011. «A Unique Chromatin Signature Uncovers Early Developmental Enhancers in Humans». *Nature* 470(7333): 279-83.

- Ramezani, Ali et al. 2015. «Stimulation of Liver X Receptor Has Potent Anti-HIV Effects in a Humanized Mouse Model of HIV Infection». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 354(3): 376-83.
- Ramirez-Carrozzi, Vladimir R. et al. 2009. «A Unifying Model for the Selective Regulation of Inducible Transcription by CpG Islands and Nucleosome Remodeling». *Cell* 138(1): 114-28.
- Ramón-Vázquez, Ana et al. 2019. «Common and Differential Transcriptional Actions of Nuclear Receptors Liver X Receptors α and β in Macrophages». *Molecular and Cellular Biology* 39(5).
- Ramsey, Stephen A. et al. 2008. «Uncovering a Macrophage Transcriptional Program by Integrating Evidence from Motif Scanning and Expression Dynamics». *PLoS Computational Biology* 4(3). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2265556/> (23 de julio de 2019).
- Rastinejad, F., T. Perlmann, R. M. Evans, y P. B. Sigler. 1995. «Structural Determinants of Nuclear Receptor Assembly on DNA Direct Repeats». *Nature* 375(6528): 203-11.
- Rastinejad, Fraydoon, Pengxiang Huang, Vikas Chandra, y Sepideh Khorasanizadeh. 2013. «Understanding Nuclear Receptor Form and Function Using Structural Biology». *Journal of Molecular Endocrinology* 51(3): T1-21.
- Reboldi, Andrea et al. 2014. «Inflammation. 25-Hydroxycholesterol Suppresses Interleukin-1-Driven Inflammation Downstream of Type I Interferon». *Science (New York, N.Y.)* 345(6197): 679-84.
- Repa, J. J., S. D. Turley, et al. 2000. «Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers». *Science (New York, N.Y.)* 289(5484): 1524-29.
- Repa, J. J., G. Liang, et al. 2000. «Regulation of Mouse Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c Gene (SREBP-1c) by Oxysterol Receptors, LXRA α and LXRB β ». *Genes & Development* 14(22): 2819-30.

Bibliografía

Repa, J. J., y D. J. Mangelsdorf. 2000. «The Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Cholesterol Homeostasis». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 459-81.

Robinson-Rechavi, Marc, y Vincent Laudet. 2003. «Bioinformatics of Nuclear Receptors». *Methods in Enzymology* 364: 95-118.

Rong, Xin et al. 2013. «LXRs Regulate ER Stress and Inflammation through Dynamic Modulation of Membrane Phospholipid Composition». *Cell Metabolism* 18(5): 685-97.

———. 2015. «Lpcat3-Dependent Production of Arachidonoyl Phospholipids Is a Key Determinant of Triglyceride Secretion». *eLife* 4.

de la Rosa, Juan Vladimir, Ana Ramón-Vázquez, Carlos Tabraue, y Antonio Castrillo. 2019. «Analysis of LXR Nuclear Receptor Cistrome Through ChIP-Seq Data Bioinformatics». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1951: 99-109.

Rosales, Carlos. 2018. «Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?» *Frontiers in Physiology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.00113/full> (16 de junio de 2019).

Russell, D. W. et al. 1984. «Domain Map of the LDL Receptor: Sequence Homology with the Epidermal Growth Factor Precursor». *Cell* 37(2): 577-85.

Sachs, Daniela et al. 2011. «Cooperative Role of Tumour Necrosis Factor- α , Interleukin-1 β and Neutrophils in a Novel Behavioural Model That Concomitantly Demonstrates Articular Inflammation and Hypernociception in Mice». *British Journal of Pharmacology* 162(1): 72-83.

Sakai, Mashito et al. 2019. «Liver-Derived Signals Sequentially Reprogram Myeloid Enhancers to Initiate and Maintain Kupffer Cell Identity». *Immunity* 51(4): 655-670.e8.

Sallam, Tamer et al. 2016. «Feedback Modulation of Cholesterol Metabolism by the Lipid-Responsive Non-Coding RNA LeXis». *Nature* 534(7605): 124-28.

Schulman, Ira G. 2017. «Liver X Receptors Link Lipid Metabolism and Inflammation». *FEBS letters* 591(19): 2978-91.

Schultz, J. R. et al. 2000. «Role of LXRs in Control of Lipogenesis». *Genes & Development* 14(22): 2831-38.

Schwabe, J. W., L. Chapman, y D. Rhodes. 1995. «The Oestrogen Receptor Recognizes an Imperfectly Palindromic Response Element through an Alternative Side-Chain Conformation». *Structure (London, England: 1993)* 3(2): 201-13.

Schwabe, J. W., y D. Rhodes. 1991. «Beyond Zinc Fingers: Steroid Hormone Receptors Have a Novel Structural Motif for DNA Recognition». *Trends in Biochemical Sciences* 16(8): 291-96.

Scotti, Elena et al. 2013. «IDOL Stimulates Clathrin-Independent Endocytosis and Multivesicular Body-Mediated Lysosomal Degradation of the Low-Density Lipoprotein Receptor». *Molecular and Cellular Biology* 33(8): 1503-14.

Seong, Seung-Yong, y Polly Matzinger. 2004. «Hydrophobicity: An Ancient Damage-Associated Molecular Pattern That Initiates Innate Immune Responses». *Nature Reviews. Immunology* 4(6): 469-78.

Shinar, D. M. et al. 1994. «NER, a New Member of the Gene Family Encoding the Human Steroid Hormone Nuclear Receptor». *Gene* 147(2): 273-76.

Smale, Stephen T. 2010. «Pioneer Factors in Embryonic Stem Cells and Differentiation». *Current opinion in genetics & development* 20(5): 519-26.

Smale, Stephen T. 2012. «Dimer-Specific Regulatory Mechanisms within the NF-KB Family of Transcription Factors». *Immunological Reviews* 246(1): 193-204.

Smale, Stephen T., Alexander Tarakhovsky, y Gioacchino Natoli. 2014. «Chromatin Contributions to the Regulation of Innate Immunity». *Annual Review of Immunology* 32(1): 489-511.

Bibliografía

Song, C., R. A. Hiipakka, J. M. Kokontis, y S. Liao. 1995. «Ubiquitous Receptor: Structures, Immunocytochemical Localization, and Modulation of Gene Activation by Receptors for Retinoic Acids and Thyroid Hormones». *Annals of the New York Academy of Sciences* 761: 38-49.

Spann, Nathanael J. et al. 2012. «Regulated Accumulation of Desmosterol Integrates Macrophage Lipid Metabolism and Inflammatory Responses». *Cell* 151(1): 138-52.

Struhl, Kevin, y Eran Segal. 2013. «Determinants of Nucleosome Positioning». *Nature Structural & Molecular Biology* 20(3): 267-73.

Surjit, Milan et al. 2011. «Widespread Negative Response Elements Mediate Direct Repression by Agonist-Liganded Glucocorticoid Receptor». *Cell* 145(2): 224-41.

Suzuki, Nobutaka et al. 2002. «Severe Impairment of Interleukin-1 and Toll-like Receptor Signalling in Mice Lacking IRAK-4». *Nature* 416(6882): 750-56.

Takeuchi, Osamu, y Shizuo Akira. 2010. «Pattern Recognition Receptors and Inflammation». *Cell* 140(6): 805-20.

Tavian, Manuela, y Bruno Peault. 2003. «Embryonic Development of the Human Hematopoietic System». *International Journal of Developmental Biology* 49(2-3): 243-50.

Tetel, Marc J., Anthony P. Auger, y Thierry D. Charlier. 2009. «Who's in Charge? Nuclear Receptor Coactivator and Corepressor Function in Brain and Behavior». *Frontiers in Neuroendocrinology* 30(3): 328-42.

Thomas, David G. et al. 2018. «LXR Suppresses Inflammatory Gene Expression and Neutrophil Migration through Cis-Repression and Cholesterol Efflux». *Cell Reports* 25(13): 3774-3785.e4.

Thomas, Karen E. et al. 2006. «Contribution of Interferon-Beta to the Murine Macrophage Response to the Toll-like Receptor 4 Agonist, Lipopolysaccharide». *The Journal of Biological Chemistry* 281(41): 31119-30.

Tian, Jing, Joseph L. Goldstein, y Michael S. Brown. 2016. «Insulin Induction of SREBP-1c in Rodent Liver Requires LXR α -C/EBP β Complex». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(29): 8182-87.

Tice, Colin M. et al. 2014. «The Medicinal Chemistry of Liver X Receptor (LXR) Modulators». *Journal of Medicinal Chemistry* 57(17): 7182-7205.

Tong, Ann-Jay et al. 2016. «A Stringent Systems Approach Uncovers Gene-Specific Mechanisms Regulating Inflammation». *Cell* 165(1): 165-79.

Uhlenhaut, N. Henriette et al. 2013. «Insights into Negative Regulation by the Glucocorticoid Receptor from Genome-Wide Profiling of Inflammatory Cistromes». *Molecular Cell* 49(1): 158-71.

Ulrichs, Peter, Frank Peelman, Rudi Beyaert, y Jan Tavernier. 2007. «MAPPIT analysis of TLR adaptor complexes». *FEBS Letters* 581(4): 629-36.

Valledor, Annabel F. et al. 2004. «Activation of Liver X Receptors and Retinoid X Receptors Prevents Bacterial-Induced Macrophage Apoptosis». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(51): 17813-18.

Venkateswaran, A. et al. 2000. «Control of Cellular Cholesterol Efflux by the Nuclear Oxysterol Receptor LXR Alpha». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(22): 12097-102.

Venteclef, Nicolas et al. 2010. «GPS2-Dependent Corepressor/SUMO Pathways Govern Anti-Inflammatory Actions of LRH-1 and LXR β in the Hepatic Acute Phase Response». *Genes & Development* 24(4): 381-95.

Wagner, Brandee L. et al. 2003. «Promoter-Specific Roles for Liver X Receptor/Corepressor Complexes in the Regulation of ABCA1 and SREBP1 Gene Expression». *Molecular and Cellular Biology* 23(16): 5780-89.

Wang, Bo, y Peter Tontonoz. 2018. «Liver X Receptors in Lipid Signalling and Membrane Homeostasis». *Nature Reviews. Endocrinology* 14(8): 452-63.

Bibliografía

Wang, Jianwei et al. 2014. «A Differentiation Checkpoint Limits Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal in Response to DNA Damage». *Cell* 158(6): 1444.

Wang, Shuai, Qianhong Ye, Xiangfang Zeng, y Shiyan Qiao. 2019. «Functions of Macrophages in the Maintenance of Intestinal Homeostasis.» *Journal of immunology research* 2019: 1512969.

Warrington, Richard, Wade Watson, Harold L. Kim, y Francesca Romana Antonetti. 2011. «An Introduction to Immunology and Immunopathology.» *Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 7 Suppl 1: S1.

Weatherman, R. V., R. J. Fletterick, y T. S. Scanlan. 1999. «Nuclear-Receptor Ligands and Ligand-Binding Domains». *Annual Review of Biochemistry* 68: 559-81.

Weikum, Emily R., Xu Liu, y Eric A. Ortlund. 2018. «The Nuclear Receptor Superfamily: A Structural Perspective». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 27(11): 1876-92.

Weikum, Emily R., Micheal L. Tuntland, Michael N. Murphy, y Eric A. Ortlund. 2016. «A Structural Investigation into Oct4 Regulation by Orphan Nuclear Receptors, Germ Cell Nuclear Factor (GCNF), and Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1)». *Journal of Molecular Biology* 428(24 Pt B): 4981-92.

Westerterp, Marit et al. 2013. «Deficiency of ATP-Binding Cassette Transporters A1 and G1 in Macrophages Increases Inflammation and Accelerates Atherosclerosis in Mice». *Circulation Research* 112(11): 1456-65.

Wherry, E. John, y David Masopust. 2016. «Adaptive Immunity: Neutralizing, Eliminating, and Remembering for the Next Time». *Viral Pathogenesis: From Basics to Systems Biology: Third Edition*: 57-69.

Willy, P. J. et al. 1995. «LXR, a Nuclear Receptor That Defines a Distinct Retinoid Response Pathway». *Genes & Development* 9(9): 1033-45.

Wong, Jenny, Carmel M. Quinn, y Andrew J. Brown. 2006. «SREBP-2 Positively Regulates Transcription of the Cholesterol Efflux Gene, ABCA1, by Generating Oxysterol Ligands for LXR». *The Biochemical Journal* 400(3): 485-91.

Wurtz, J. M. et al. 1996. «A Canonical Structure for the Ligand-Binding Domain of Nuclear Receptors». *Nature Structural Biology* 3(1): 87-94.

Xu, Eric H., y Millard H. Lambert. 2003. «Structural Insights into Regulation of Nuclear Receptors by Ligands». *Nuclear Receptor Signaling* 1: e004.

Yamamoto, Masahiro, Shintaro Sato, Hiroaki Hemmi, Katsuaki Hoshino, et al. 2003. «Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-like Receptor Signaling Pathway». *Science (New York, N.Y.)* 301(5633): 640-43.

Yamamoto, Masahiro, Shintaro Sato, Hiroaki Hemmi, Satoshi Uematsu, et al. 2003. «TRAM Is Specifically Involved in the Toll-like Receptor 4-Mediated MyD88-Independent Signaling Pathway». *Nature Immunology* 4(11): 1144-50.

Ye, Tao et al. 2011. «SeqMINER: An Integrated ChIP-Seq Data Interpretation Platform». *Nucleic Acids Research* 39(6): e35.

Yoshikawa, Tomohiro et al. 2002. «Polyunsaturated Fatty Acids Suppress Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c Promoter Activity by Inhibition of Liver X Receptor (LXR) Binding to LXR Response Elements». *The Journal of Biological Chemistry* 277(3): 1705-11.

Yu, Liqing et al. 2003. «Stimulation of Cholesterol Excretion by the Liver X Receptor Agonist Requires ATP-Binding Cassette Transporters G5 and G8». *The Journal of Biological Chemistry* 278(18): 15565-70.

Zaret, Kenneth S., y Jason S. Carroll. 2011. «Pioneer Transcription Factors: Establishing Competence for Gene Expression». *Genes & Development* 25(21): 2227-41.

Zelcer, Noam, Cynthia Hong, Rima Boyadjian, y Peter Tontonoz. 2009. «LXR Regulates Cholesterol Uptake through Idol-Dependent Ubiquitination of the LDL Receptor». *Science (New York, N.Y.)* 325(5936): 100-104.

Bibliografía

Zelcer, Noam, y Peter Tontonoz. 2006. «Liver X Receptors as Integrators of Metabolic and Inflammatory Signaling». *The Journal of Clinical Investigation* 116(3): 607-14.

Zhai, Weijie et al. 2019. «The Immune Escape Mechanisms of Mycobacterium Tuberculosis». *International Journal of Molecular Sciences* 20(2).

Zhang, Yuan et al. 2012. «Liver LXR α Expression Is Crucial for Whole Body Cholesterol Homeostasis and Reverse Cholesterol Transport in Mice». *The Journal of Clinical Investigation* 122(5): 1688-99.

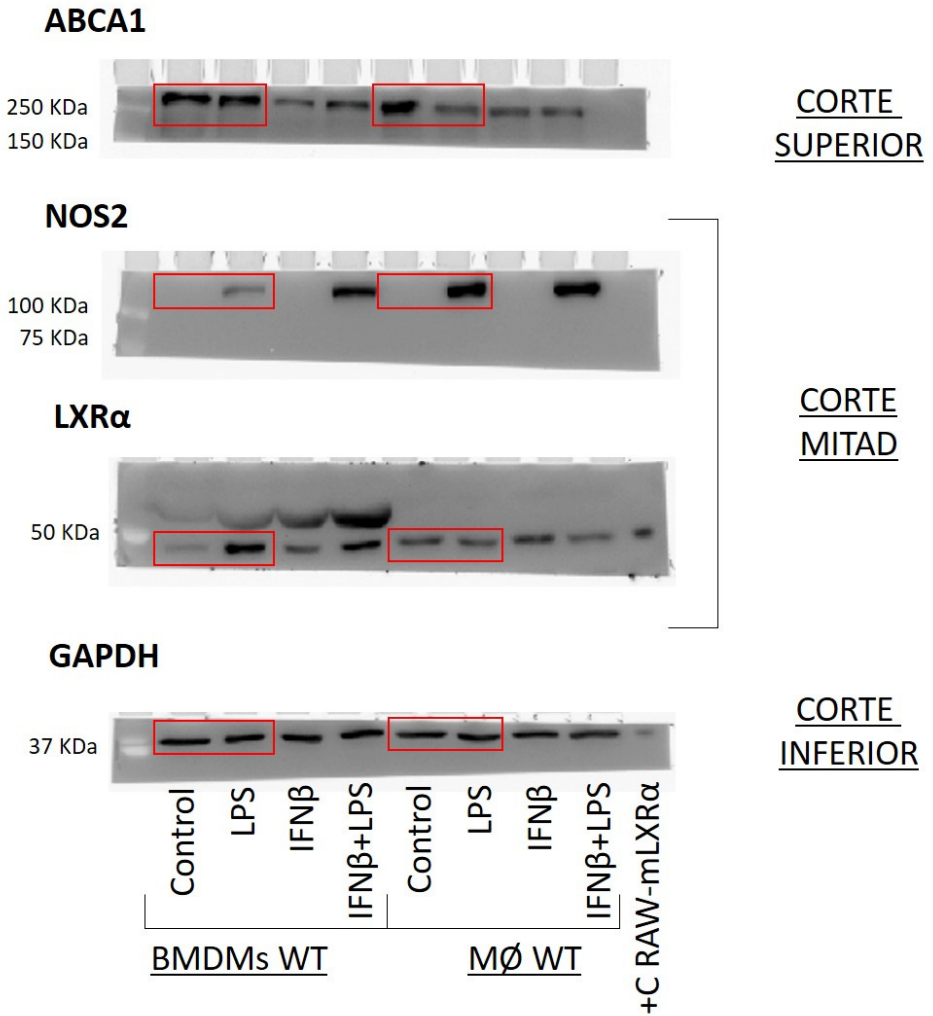
Zhou, Ying, Yan Hong, y Haihua Huang. 2016. «Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF-KB Signaling Pathway». *Kidney & Blood Pressure Research* 41(6): 901-10.

Zhou, Yingyao et al. 2019. «Metascape Provides a Biologist-Oriented Resource for the Analysis of Systems-Level Datasets». *Nature Communications* 10(1): 1523.

Zuercher, William J. et al. 2010. «Discovery of Tertiary Sulfonamides as Potent Liver X Receptor Antagonists». *Journal of Medicinal Chemistry* 53(8): 3412-16.

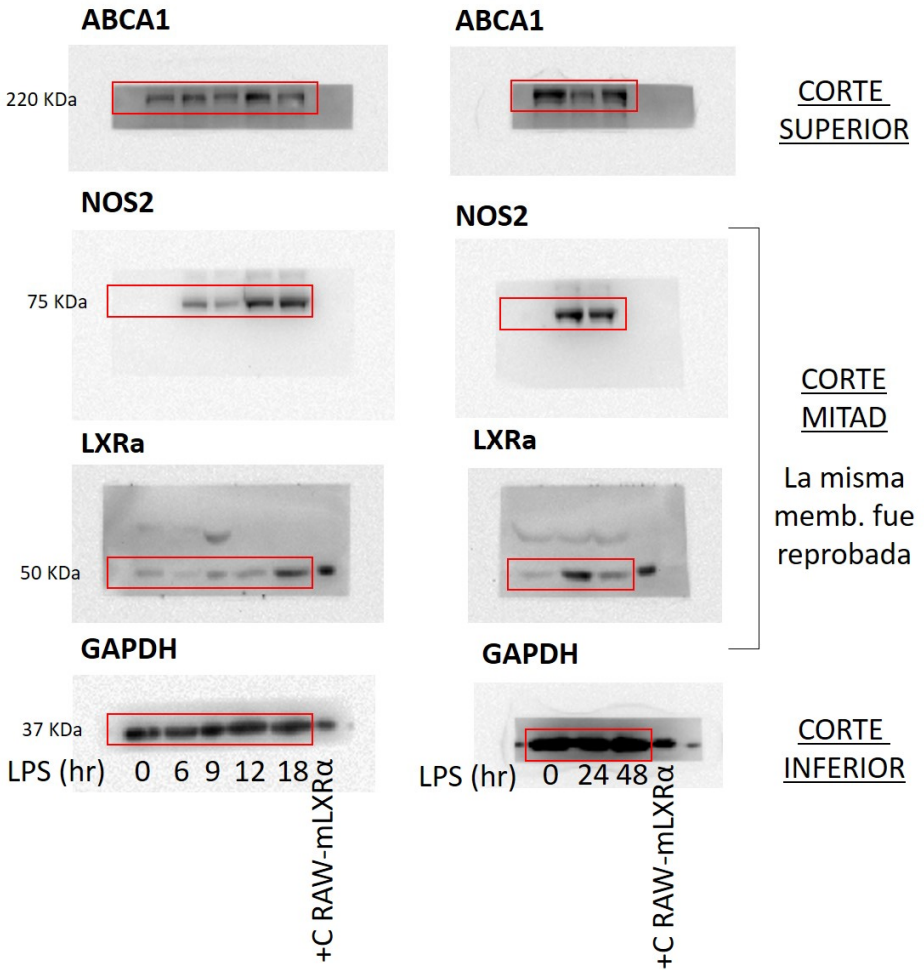
ANEXO I. BOLTS ORIGINALES

Membranas usadas para el WB de la Figura 13

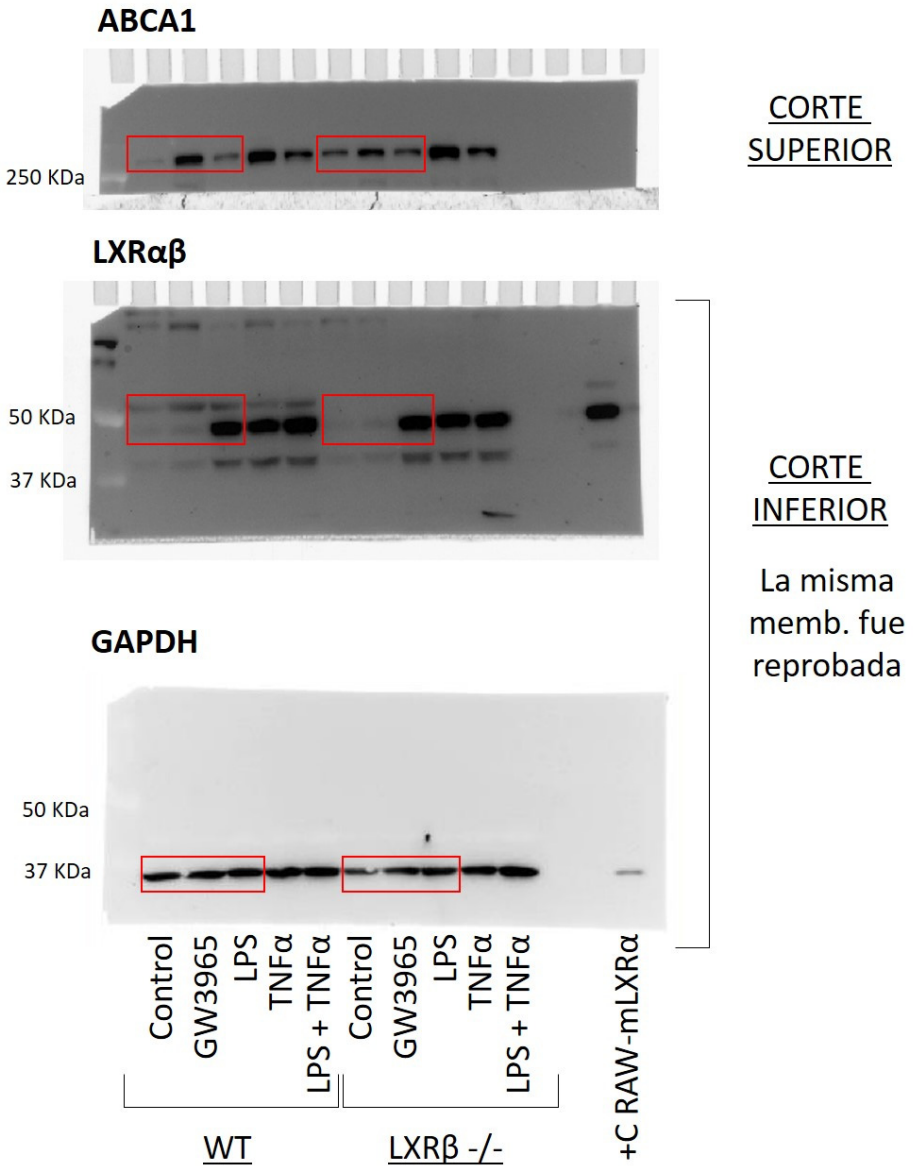


Anexo I. Blots originales

Membranas usadas para el WB de la Figura 14B

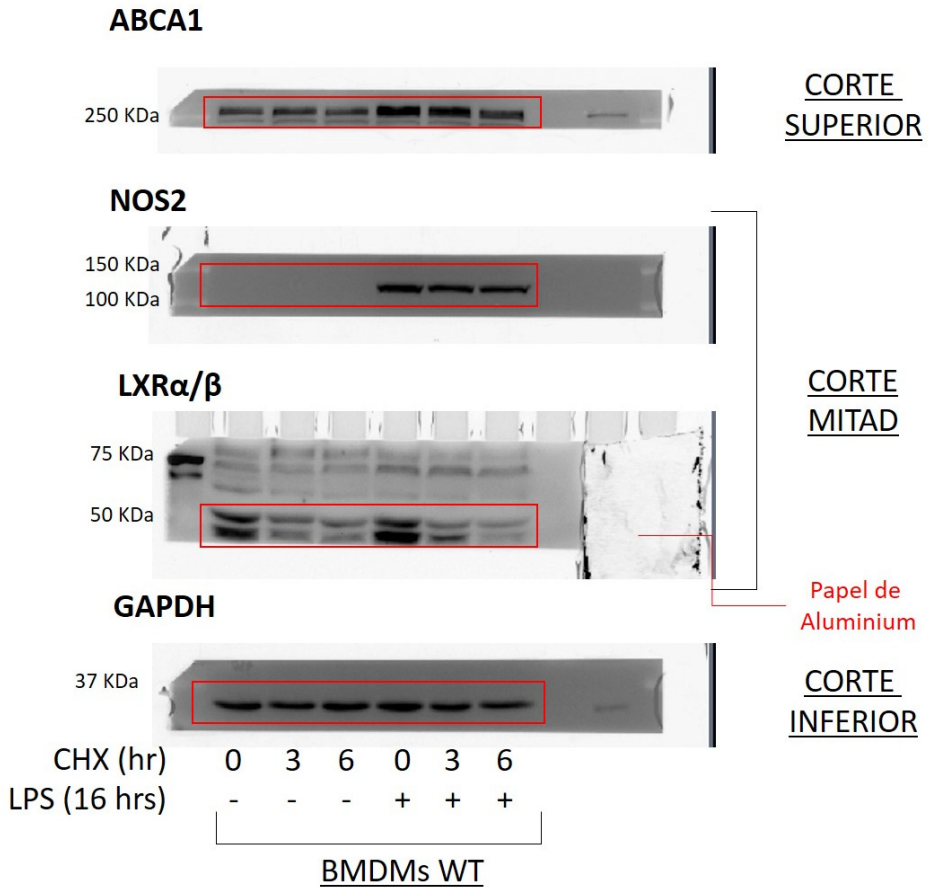


Membranas usadas para el WB de la Figura 14C

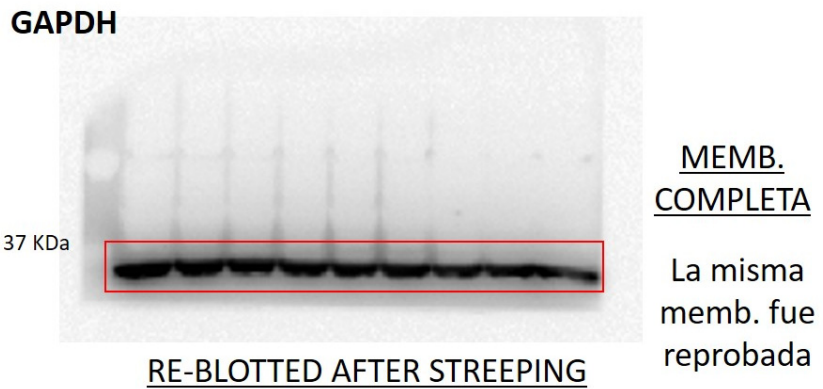
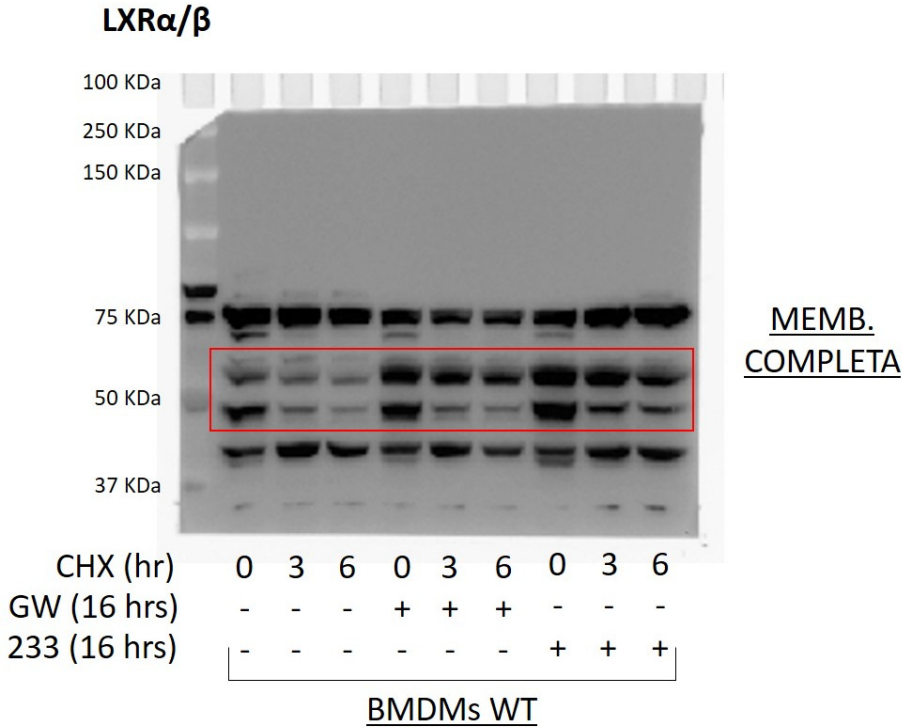


Anexo I. Blots originales

Membranas usadas para el WB de la Figura 15A

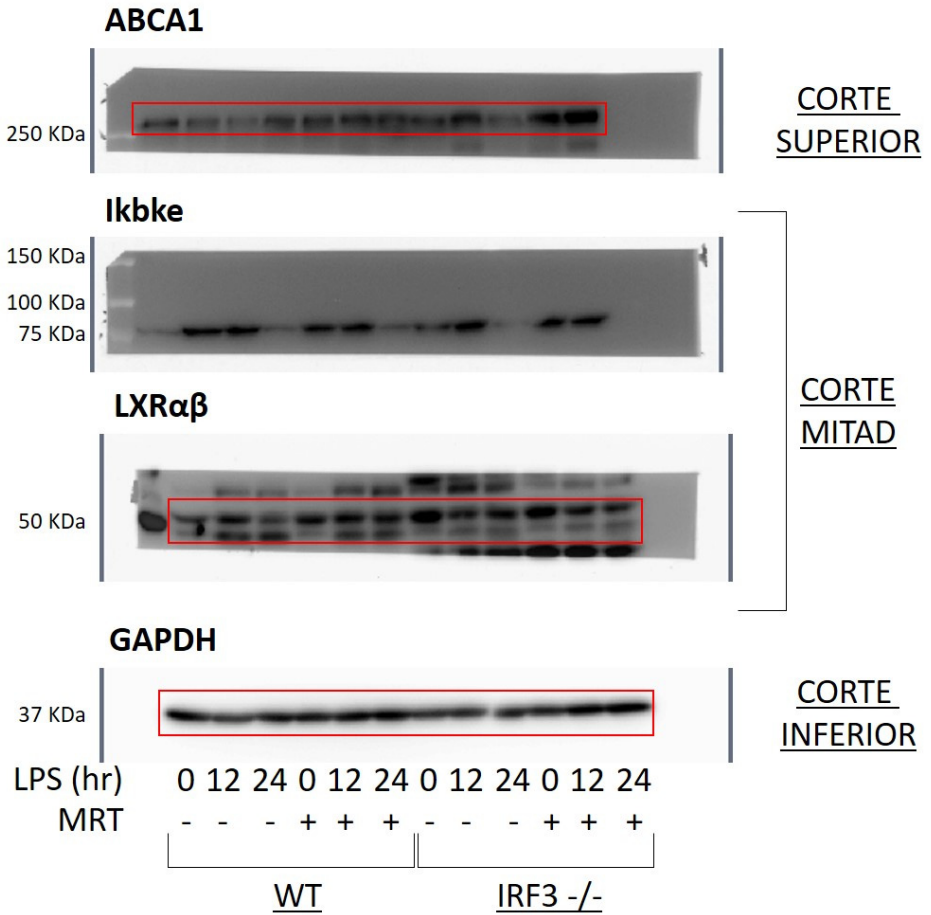


Membranas usadas para el WB de la Figura 15B

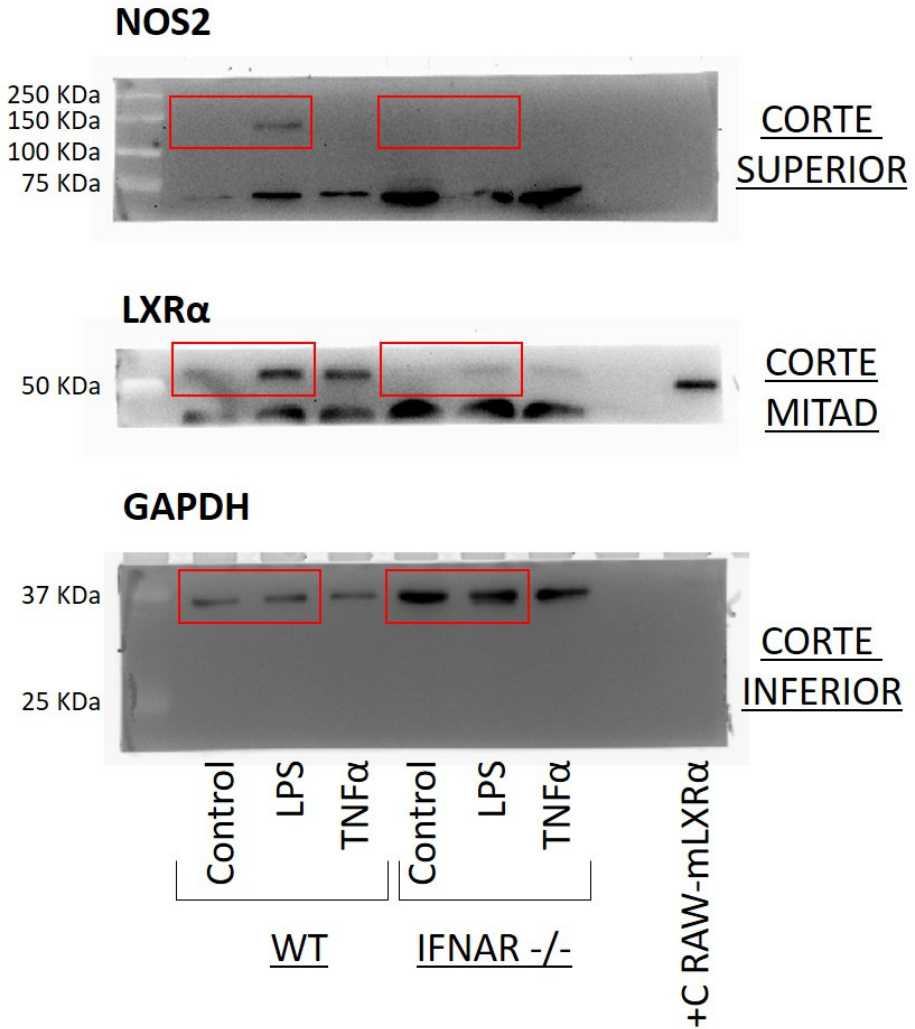


Anexo I. Blots originales

Membranas usadas para el WB de la Figura 19



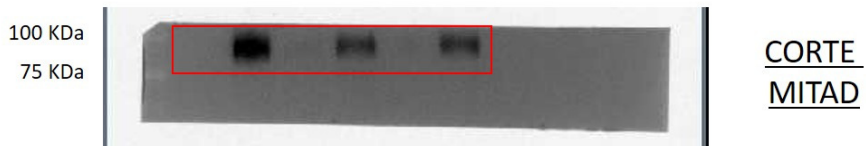
Membranas usadas para el WB de la Figura 20



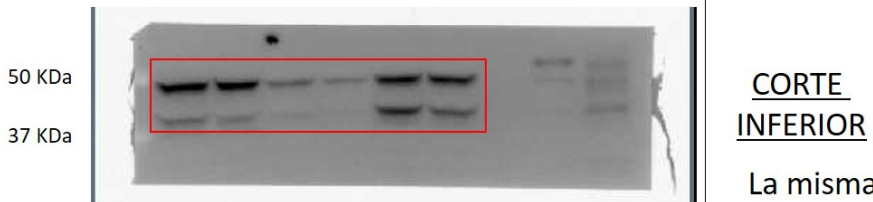
Anexo I. Blots originales

Membranas usadas para la especificidad del Ab Karolinska

ABCA1



LXR α (Abcam)



La misma memb. fue recortada Para evitar La señal de la banda inespecífica superior

LXR α / β (Karolinska)



ANEXO II. FINANCIACIÓN



El trabajo experimental de la presente memoria fue desarrollado por D. Juan Vladimir de la Rosa Medina en el Departamento de Morfología de la Facultad de Ciencias de la Salud en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), y en la unidad de Biomedicina (Unidad Asociada al CSIC), Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias, Grupo de Investigación Medioambiente y Salud (IUIBS – GIMAS).

Este trabajo ha podido ser desarrollado gracias a la ayuda del Proyecto INNOVA 2011 de la Fundación Universitaria de Las Palmas (FULP) y a la ayuda de los proyectos nacionales financiados por el MICINN y MINECO SAF2008-00057 y SAF2011-29244.

ANEXO III.

Curriculum Vitae

1. Formación Académica

- Licenciado en Biología. Universidad de La Laguna (2000).
- Memoria de Licenciatura. “Regulación de la expresión de GTP-Ciclohidrolasa en células tumorales de pulmón: Relación con la biosíntesis de Prostaglandinas y la proliferación celular” Universidad de la Laguna (2000).

Diploma de Estudios Avanzados. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (2012).

2. Publicaciones

- **SUCNR1 controls an anti-inflammatory program in macrophages to regulate the metabolic response to obesity.** Keiran N, Ceperuelo-Mallafre V, Calvo E, Hernández-Alvarez MI, Ejarque M, Núñez-Roa C, Horrillo D, Maymó-Masip E, Rodríguez MM, Fradera R, de la Rosa JV, Jorba R, Megia A, Zorzano A, Medina-Gómez G, Serena C, Castrillo A, Vendrell J, Fernández-Veledo S. *Nat Immunol.* 2019 May;20(5):581-592. doi: 10.1038/s41590-019-0372-7. Epub 2019 Apr 8. J.I.F. 23.530; Q1 (2018). Source: Scimago Journal Ranking.
- **LXR Signaling Regulates Macrophage Survival and Inflammation in Response to Ionizing Radiation.** Tabraue C, Lara PC, De Mirecki-Garrido M, De La Rosa JV, López-Blanco F, Fernández-Pérez L, Boscá L, Castrillo A. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2019 Jul 15;104(4):913-923. doi: 10.1016/j.ijrobp.2019.03.028. Epub 2019 Mar 25. J.I.F. 6.023; Q1 (2018). Source: Scimago Journal Ranking.
- **Analysis of LXR Nuclear Receptor Cistrome Through ChIP-Seq Data Bioinformatics.** de la Rosa JV, Ramón-Vázquez A, Tabraue C,

Anexo III. Curriculum Vitae

Castrillo A. *Methods Mol Biol.* 2019;1951:99-109. doi: 10.1007/978-1-4939-9130-3_8. J.I.F. 10.710; Q3 (2018). Source: Scimago Journal Ranking.

- **Bone Marrow-Derived Macrophage Immortalization of LXR Nuclear Receptor-Deficient Cells.** Ramón-Vázquez A, de la Rosa JV, Tabraue C, Castrillo A. *Methods Mol Biol.* 2019;1951:75-85. doi: 10.1007/978-1-4939-9130-3_6. J.I.F. 10.710; Q3 (2018). Source: Scimago Journal Ranking
- **Common and Differential Transcriptional Actions of Nuclear Receptors Liver X Receptors α and β in Macrophages.** Ramón-Vázquez A, de la Rosa JV, Tabraue C, Lopez F, Díaz-Chico BN, Bosca L, Tontonoz P, Alemany S, Castrillo A. *Mol Cell Biol.* 2019 Feb 15;39(5). pii: e00376-18. doi: 10.1128/MCB.00376-18. Print 2019 Mar 1. J.I.F. 4.671; Q1 (2018). Source: Scimago Journal Ranking
- **Phenalenone-photodynamic therapy induces apoptosis on human tumor cells mediated by caspase-8 and p38-MAPK activation.** Salmerón ML, Quintana-Aguilar J, De La Rosa JV, López-Blanco F, Castrillo A, Gallardo G, Tabraue C. *Mol Carcinog.* 2018 Nov;57(11):1525-1539. doi: 10.1002/mc.22875. Epub 2018 Aug 22. J.I.F. 3.411; Q2 (2018). Source: Scimago Journal Ranking.
- **Disrupting LXR α phosphorylation promotes FoxM1 expression and modulates atherosclerosis by inducing macrophage proliferation.** Gage MC, Bécares N, Louie R, Waddington KE, Zhang Y, Tittanegro TH, Rodríguez-Lorenzo S, Jathanna A, Pourcet B, Pello OM, De la Rosa JV, Castrillo A, Pineda-Torra I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Jul 10;115(28):E6556-E6565. doi: 10.1073/pnas.1721245115. Epub 2018 Jun 27. J.I.F. 9.580; Q1 (2018). Source: Scimago Journal Ranking.

- **MAFB Determines Human Macrophage Anti-Inflammatory Polarization: Relevance for the Pathogenic Mechanisms Operating in Multicentric Carpotarsal Osteolysis.** Cuevas VD, Anta L, Samaniego R, Orta-Zavalza E, Vladimir de la Rosa J, Baujat G, Domínguez-Soto Á, Sánchez-Mateos P, Escribese MM, Castrillo A, Cormier-Daire V, Vega MA, Corbí ÁL. *J Immunol.* 2017 Mar 1;198(5):2070-2081. doi: 10.4049/jimmunol.1601667. Epub 2017 Jan 16. J.I.F. 4.539; Q1 (2017). Source: Scimago Journal Ranking.
- **Fungal pattern receptors down-regulate the inflammatory response by a cross-inhibitory mechanism independent of interleukin-10 production.** Rodríguez M, Márquez S, de la Rosa JV, Alonso S, Castrillo A, Sánchez Crespo M, Fernández N. *Immunology.* 2017 Feb;150(2):184-198. doi: 10.1111/imm.12678. Epub 2016 Nov 9. J.I.F. 3.358; Q1 (2017). Source: Scimago Journal Ranking.
- **The nuclear receptor LXR α controls the functional specialization of splenic macrophages.** A-Gonzalez N, Guillen JA, Gallardo G, Diaz M, de la Rosa JV, Hernandez IH, Casanova-Acebes M, Lopez F, Tabraue C, Beceiro S, Hong C, Lara PC, Andujar M, Arai S, Miyazaki T, Li S, Corbi AL, Tontonoz P, Hidalgo A, Castrillo A. *Nat Immunol.* 2013 Aug;14(8):831-9. doi: 10.1038/ni.2622. Epub 2013 Jun 16. J.I.F. 34.765; Q1 (2013). Source: Scimago Journal Ranking.
- **Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptothecodinium cohnii*.** Adelina de la Jara, Héctor Mendoza, Antera Martel, Cristina Molina, Laurette Nordström, Vladimir de la Rosa, Ricardo Díaz. *Journal of Applied Phycology.* September 2003, Volume 15, Issue 5, pp 433–438. J.I.F. 0.828; Q3 (2003). Source: Scimago Journal Ranking.

Anexo III. Curriculum Vitae

3. Comunicaciones a Congresos

- **Lxr Signaling Regulates Macrophage Survival and Phenotype Polarization Response to Ionizing Radiation.** Lara Jimenez, P. C.; Tabraue, C.; Mirecki, M; De La Rosa, J. V; López-Blanco, F; Bosca, L; Fernandez, L; Castrillo, A. European Society for Radiotherapy and Oncology (ESTRO). Ponencia oral. Milán, Italia. Abril 2019.
- **Common and differential transcriptional actions LXRa and LXRb in murine macrophages.** Ramón, Ana; de la Rosa, Juan Vladimir; Tabraue, Carlos; López Blanco, Félix; Celorio, Marta; Boscá, Lisardo; Alemany, Susana; Castrillo, Antonio. European Macrophage & Dendritic Cell Society. Póster. Madrid, España. Septiembre 2017.
- **The role of Liver X Receptors in the homeostasis of splenic red pulp macrophages and iron metabolism.** Celorio, Marta; Sánchez, Ángela; de la Rosa, Juan Vladimir; Alemany, Susana; Castrillo, Antonio. European Macrophage & Dendritic Cell Society. Póster. Madrid, España. Septiembre 2017.
- **The role of nuclear receptor LXRa during late phases of TLR-induced inflammation in murine macrophages.** de la Rosa, Juan Vladimir; Tabraue, Carlos; Ramón, Ana; Valledor, Annabel; López Blanco, Félix; Alemany, Susana; Boscá, Lisardo; Castrillo, Antonio. European Macrophage & Dendritic Cell Society. Póster. Madrid, España. Septiembre 2017.
- **Variación de la composición de ácidos grasos de *Cryptocodinium conorii* en condiciones de supresión de nitrógeno.** Mendoza, H.; de la Jara, A.; de la Rosa, V; Nordstrom, L; Molina Cedros, C. Congreso Nacional de Acuicultura. Cádiz, España. Mayo 2003.

Anexo III. Curriculum Vitae

- **Estudio de la activación de la Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS) en Doradas (*Sparus aurata*) infectadas experimentalmente con *Photobacterium damsela* Subs. *piscida* (PDP).** Acosta, F; Gómez, V; Padilla, D; Díaz, R; De la Rosa, V; Ruiz de Galarreta. C.M. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Póster. León, España. Septiembre 2002.
- **Papel de la Tetrahydrobiopterina (BH4) en la adquisición del fenotipo diferenciado inducido por la FSH en la célula granulosa ovárica (CGO).** Tabraue, C; Díaz, R; de la Rosa, V; Gallardo, G; Hernández, I; Fanjul, LF; Ruiz de Galarreta, C.M. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Póster. León, España. Septiembre 2002.
- **Papel de la Tetrahydrobiopterina (BH4) en la regulación de la expresión y actividad de COX2 en la célula granulosa ovárica (CGO) y en las células A549.** Díaz, R; de la Rosa, V; Gallardo, G; López Blanco, F; Santana, P; Tabraue, C; Ruiz de Galarreta, CM. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Póster. León, España. Septiembre 2002.
- **El factor activador de plaquetas (PAF) inhibe la esteroidogénesis y expresión de STAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein), inducida por Hormona Luteinizante (LH) en células tumorales de Leydig (MA10).** Gallardo, G; Díaz, R; Hernández, I; Tabraue, C; de la Rosa, V; Ruiz de Galarreta, C.M; López Blanco, F. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Póster. León, España. Septiembre 2002.
- **La Hemo-Oxigenasa Inducible (HO1) se expresa de forma constitutiva en placenta y vasos umbilicales y se regula negativamente en gestantes fumadoras.** Díaz, R; Santana, P; de la

Anexo III. Curriculum Vitae

Rosa, V; García Hernández, JA; Ramírez García, O; Ruiz de Galarreta, C.M; Díaz Herrera, P. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Póster. León, España. Septiembre 2002.