



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Papel del receptor nuclear LXR en la proliferación y perfil metastático de células tumorales y en la actividad de macrófagos asociados a tumor

José M^a Carbó Marqués

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR LXR EN LA
PROLIFERACIÓN Y PERFIL METASTÁTICO DE CÉLULAS
TUMORALES Y EN LA ACTIVIDAD DE MACRÓFAGOS
ASOCIADOS A TUMOR



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de doctorado de Biomedicina
Departamento de Biología celular, Fisiología e Inmunología

Memoria presentada por
José M^a Carbó Marqués

Para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Barcelona

Doctorando:
José M^a Carbó Marqués

Dirección:
Annabel Valledor Fernández

Barcelona, Septiembre 2017

Tabla de contenido

ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	17
1. SISTEMA INMUNITARIO Y CÁNCER	19
1.1 GENERALIDADES SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO	21
1.2 INFLAMACIÓN ASOCIADA AL CÁNCER	24
1.3 METÁSTASIS Y GENES INFLAMATORIOS	26
2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE IL-4 Y GM-CSF	39
2.1 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE IL-4	39
2.2 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE GM-CSF	41
2.3 EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN IRF4	42
3. RECEPTORES NUCLEARES	45
3.1 LIVER X RECEPTORS	48
3.2 LIVER X RECEPTORS EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO	50
3.3 PAPEL ANTI-INFLAMATORIO DE LOS LIVER X RECEPTORS	52
3.4 LXR EN LA REGULACIÓN DE OTRAS FUNCIONES DEL SISTEMA INMUNITARIO	57
3.5 LXR EN EL CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN	58
4. HIPÓTESIS	63
OBJETIVOS	65
MATERIALES Y MÉTODOS	69
RESULTADOS	89
ESTUDIO 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE LXR SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A METÁSTASIS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANAS	91

1.1 ESTUDIO DEL PAPEL DE LXR SOBRE LA PROLIFERACIÓN TUMORAL EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANAS.	91
1.2 ESTUDIO DEL PAPEL DE LXR SOBRE EL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADO A METÁSTASIS DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HACIA PULMÓN O HUESO.	108
<u>ESTUDIO 2. PAPEL DE LXR SOBRE LA EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS EN MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMOR.</u>	114
<u>DISCUSIÓN</u>	143
<u>CONCLUSIONES</u>	155

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1	The hallmarks of cancer: next generation	20
Figura 2	Funciones pro-tumorales de los TAM	34
Figura 3	Distintos fenotipos de los macrófagos tumorales	38
Figura 4	Señalización a través del receptor de IL-4	40
Figura 5	El receptor de GM-CSF. Iniciación de la transducción de señal de GM-CSF	43
Figura 6	Estructura común de los receptores nucleares	46
Figura 7	La superfamilia de los Receptores Nucleares	47
Figura 8	Mecanismo molecular de la activación de la transcripción por LXR	50
Figura 9	Papel de los LXR en el sistema inmunitario	54
Figura 10	Mecanismo de transrepresión de genes inflamatorios mediada por LXR	56
Figura 11	Moléculas del ciclo celular afectadas por los LXR	61
Figura 12	Obtención de clones de BM-1833 y LM2-4175 que expresan de forma estable FLAG-LXR α	70
Figura 13	Poblaciones de células mieloides presentes en el microambiente tumoral	76
Figura 14	Análisis del ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo	81
Figura 15	Generación de las construcciones de Ccl17 enhancer 1, 2 y 3	85
Figura 16	Efectos de la expresión estable de LXR α sobre la proliferación de células metastáticas	92
Figura 17	El tratamiento con T1317 reduce la proliferación de las células LM2-4175 de manera dosis-dependiente	94
Figura 18	El tratamiento con T1317 reduce la proliferación de las células BM-	95

	1833 de manera dosis-dependiente	
Figura 19	Los LXR frenan la progresión del ciclo celular	97
Figura 20	El tratamiento con T1317 reprime la expresión del gen MAFB	98
Figura 21	Efectos de los LXR sobre la expresión génica de las células LM-4175-LXR α	100
Figura 22	El tratamiento con T1317 reprime la expresión del gen SKP2	103
Figura 23	El tratamiento con T1317 no incrementa los niveles de p27 en las células BM-1833 y LM2-4175	104
Figura 24	El tratamiento con T1317 reprime la expresión del gen PMEPA1	106
Figura 25	El tratamiento con T1317 induce del gen p21	107
Figura 26	La activación de los LXR modifica levemente el perfil de expresión génica asociado a metástasis a pulmón	109
Figura 27	LXR regula negativamente la expresión de un subconjunto de genes asociados a metástasis a pulmón en las células LM2-4175-LXR α	111
Figura 28	El tratamiento con agonista de LXR ejerce efectos represores discretos sobre la expresión de genes relevantes biológicamente en la inducción de metástasis a hueso	112
Figura 29	Los agonistas de LXR inhiben la proliferación de las células 3LLR de manera dosis-dependiente	116
Figura 30	La activación de LXR inhibe el crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	117
Figura 31	La activación de LXR no afecta a los porcentajes de poblaciones mieloides presentes en el microambiente tumoral	120
Figura 32	LXR reprime <i>in vivo</i> la expresión de CCL17 en MHCII ^{High} TAM	122
Figura 33	Los LXR reprimen <i>ex vivo</i> la expresión de Ccl17 y Ccl22 en MHCII ^{Low} TAM	123
Figura 34	LXR reduce la concentración de CCL17 en el microambiente tumoral	124
Figura 35	Il-4 y GM-CSF inducen la expresión de Ccl17 y Ccl22	125

Figura 36	Los agonistas de LXR reprimen la inducción por IL-4 de la expresión de Ccl17 y Ccl22	126
Figura 37	Los agonistas de LXR reprimen la inducción por GM-CSF de la expresión de Ccl17 y Ccl22	127
Figura 38	La inducción de Ccl17 y Ccl22 por IL-4 o GM-CSF es dependiente de IRF4 e independiente de JunD y JunB	128
Figura 39	T1317 reprime la inducción por IL-4 de la expresión de Irf4	131
Figura 40	Los LXR reprimen la inducción por GM-CSF de la expresión de Irf4	132
Figura 41	Los LXR no reprimen la expresión de Jmjd3	133
Figura 42	La inducción por IL-4 de Ym1, Mgl1, Mrc1 y Arg1 es Irf4 independiente	134
Figura 43	IRF4 aparece reclutado en tres regiones cercanas a Ccl17 durante la diferenciación de linfocitos Th17	137
Figura 44	Secuencia de las regiones Ccl17 enhancer 1, 2 y 3	138
Figura 45	Los agonistas de LXR reprimen la actividad del enhancer 2 de Ccl17	140
Figura 46	Los LXR reprimen la expresión de Irf4 en macrófagos tumorales	141
<hr/>		
Tabla 1	Perfil de expresión génica asociado a metástasis a pulmón	28
Tabla 2	Perfil de expresión génica asociado a metástasis a hueso	30
Tabla 3	Anticuerpos unidos a fluoróforo utilizados en citometría y separación celular	77
Tabla 4	Primers usados para el análisis de la expresión génica	78
Tabla 5	Primers utilizados en la generación de las construcciones Ccl17 enhancer 1, 2 y 3	83
Tabla 6	Funciones biológicas enriquecidas entre los genes afectados por el tratamiento con T1317 en las células LM2-4175-LXR α	102

Abreviaturas

ABC - *ATP-binding cassette*
AP1 - *Activated protein 1*
APC - *Antigen presenting cell*
BATF - *Basic leucine zipper transcription factor*
BCR - *B cell receptor*
CAR - *Constitutive adrosante receptor*
CCL17 - *CC chemokine ligand 17*
CCL22 - *CC chemokine ligand 22*
CCR4 - *CC chemokine receptor 4*
CD- *Cluster of differentiation*
ChREBP - *Carbohydrate responsive element-binding protein*
COUP-TF - *COUP transcription factor*
COX2 – *Cyclooxygenase 2*
CSF1 - *Colony stimulating factor 1*
CFS1R - *Colony stimulating factor 1 receptor*
CTLA4 - *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*
CXCL1 - *C-x-c motif ligand 1*
CXCR4 - *C-x-c chemokine receptor type 4*
DAX-1 - *Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*
DBD - *DNA binding domain*
EICEs - *ETS-IRF consensus motif elements*
ERR - *Estrogen related receptor*
FAS - *Fatty acid synthase*
FOXP3 - *Forkhead box P3*
FXR - *Farnesoid X receptor*

GCNF - *Germ cell nuclear factor*
GM-CSF - *Granulocyte monocyte - colony stimulating factor*
GM-CSFR α - *GM-CSF receptor alpha*
HDAC3 - *Histone deacetylase 3*
HDL - *High density lipoprotein*
HLA-C - *Human leucocyte antigen C*
HNF-4 - *Hepatocyte nuclear factor 4*
IDOL - *Inducible degrader of LDL receptor*
IFN γ - *Interferon gamma*
IL - *Interleukin*
IL-4R α - *IL-4 receptor alpha*
IL13RA2 - *IL-13 receptor alpha 2*
IRF - *Interferon regulatory factor*
IRS-1/2 - *Insulin receptor substrate 1/2*
JAK - *Janus activated kinase*
KLF4 - *Krupple like factor 4*
LBD - *Ligand binding domain*
LDL - *Low density lipoprotein*
LPS - *lipopolysaccharide*
LRH-1 - *liver receptor homolog-1*
LXRE - *LXR response element*
LY6G - *Lymphocyte antigen 6 G*
M-CSF - *Macrophage-colony stimulating factor*
MAFB - *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*
MERTK - *c-Mer tyrosine kinase*
MHC - *Major histocompatibility complex*
MHCI-KIR - *Killer inhibitor receptors*

MMP - *Matrix metalloproteinase*
NAIP - *Neural apoptosis inhibitory protein*
NCOR - *Nuclear receptor co-repressor*
NCRs - *Natural cytotoxicity receptors*
NFAT1 - *Nuclear factor of activated T cell 1*
NFκB - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NGFI-B - *Nerve growth factor 1-B like receptor*
NK - *Natural killer*
NOS2 - *Nitric oxide synthase*
PD-1 - *Programmed cell death protein 1*
PEPCK - *Phosphoenolpyruvate carboxylase*
PGC-1α - *PPAR co-activator 1 alpha*
PI3K - *Phosphatidil inositol 3 kinase*
PNR - *photoreceptor cell-specific nuclear receptor*
PPAR - *Peroxisome proliferator-activated receptor*
PXR/SXR - *Pregnane X receptor*
PyMT - *Polyoma middle T oncoprotein mouse*
MAPK - *Mitogen activated protein kinase*
ROR - *RAR-related orphan receptor*
RXR - *Retinoid X receptor*
SF-1 - *Steroidogenic factor-1*
SHP - *Small heterodimer partner*
SKP2 - *S-Phase kinase associate protein 2*
SMRT - *Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*
SREBP1c - *Sterol regulatory element-binding protein 1c*
STAT - *Signal transducer and activator of transcription*
SULT2B1 - *Sulfotransferase family 2B member 1*

TAM – *Tumor associated macrophage*
TBL1 - *transducin (beta)-like 1 X-linked*
TBLR1 - *TBL1-related protein*
T_c – *Cytotoxic T lymphocyte*
TCR - *T cell receptor*
TGFβ - *Transforming growth factor beta*
T_h – *T helper lymphocyte*
TLR - *Toll like receptor*
TLX - *Homologue of the Drosophila tailless gene*
TNFα - *Tumor necrosis factor alpha*
TR – *Testis receptor*
Treg – *Regulatory T lymphocyte*
VCAM1 - *Vascular cell adhesion 1*
VEGF - *Vascular endothelial growth factor*
WT - *Wild type*

Introducción

1. SISTEMA INMUNITARIO Y CÁNCER

En el año 2000 el artículo titulado *The Hallmarks of Cancer* (Weinberg, 2000) apuntaba una serie de capacidades funcionales adquiridas gradualmente por la mayoría de tumores a lo largo de su desarrollo (autosuficiencia en factores de crecimiento, evasión de apoptosis, insensibilidad a señales anti-crecimiento, angiogénesis sostenida, potencial de proliferación ilimitado e invasión tisular y metástasis), basadas en alteraciones genéticas que dirigen la transformación de células sanas en células malignas. Sin embargo, en este artículo ya se apuntaba que, hasta entonces, había predominado una visión reduccionista en la que se consideraba al tumor como una simple masa de células tumorales en proliferación y que, en realidad, habría que aplicar una visión heterotípica en la que el tumor es considerado como un tejido complejo, con múltiples tipos celulares que, eventualmente, pueden ser dirigidos por el tumor para favorecer su desarrollo. Una década más tarde, los mismos autores publicaban la actualización titulada *Hallmarks of Cancer: Next Generation* (Hanahan & Weinberg, 2011) en la que, entre otras cosas, se añadía a la lista de características la capacidad de evadir la detección y destrucción tumoral por parte del sistema inmunitario, se señalaba el papel clave que juega el sistema inmunitario en el establecimiento de un microambiente favorable para el desarrollo tumoral y subrayaba la necesidad de desarrollar terapias que combatan la inflamación asociada al cáncer (figura 1).

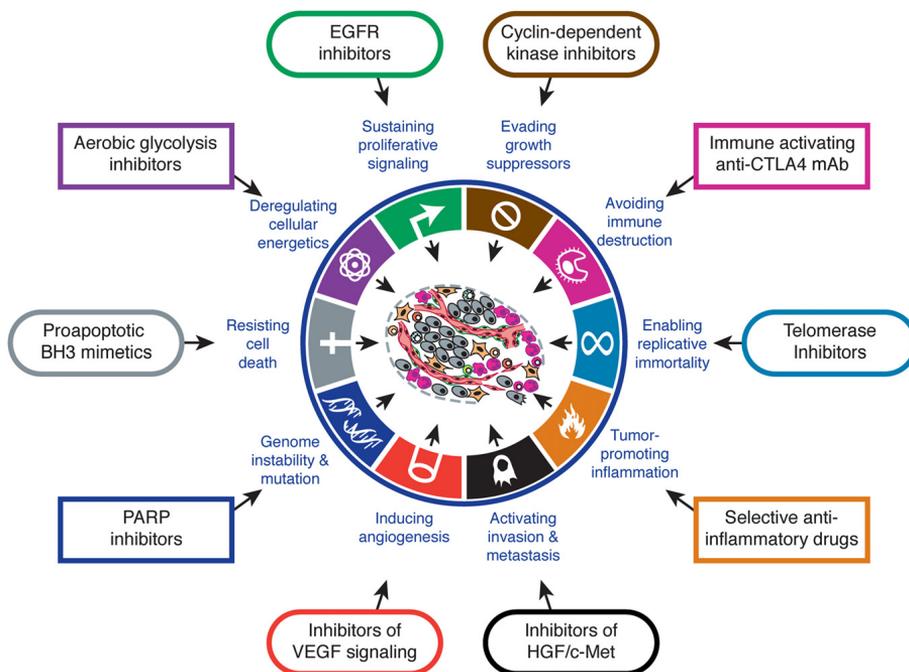


Figura 1. The hallmarks of cancer: next generation. Esta ilustración destaca en azul las capacidades adquiridas por el tumor a lo largo de su desarrollo. Enmarcadas, se señalan algunas estrategias terapéuticas que interfieren con estas capacidades adquiridas y para las que ya se han diseñado y desarrollado diversos fármacos que se encuentran en fases clínicas avanzadas, y hasta algunos de ellos han sido aprobados para su uso en diversos cánceres. Entre estas destacan aquellas enfocadas a revertir la supresión del sistema inmunitario y los fármacos anti-inflamatorios (adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).

1.1 Generalidades sobre el sistema inmunitario

El sistema inmunitario es una red compleja de células y moléculas que interactúan de manera coordinada para proteger al organismo de lesiones, infecciones o agresiones. El sistema inmunitario es capaz de reconocer una gran variedad de agentes patógenos, como virus, bacterias o parásitos, distinguiéndolos de los tejidos sanos del cuerpo. Funcionalmente, el sistema inmunitario está dividido en dos componentes: sistema inmunitario innato (menos específico) y sistema inmunitario adaptativo (más específico).

El sistema inmunitario innato supone la primera línea de defensa contra las infecciones. La mayoría de sus componentes ya están presentes antes de la agresión e incluyen células y moléculas que reconocen patrones estructurales presentes en los patógenos. Lo conforman moléculas (p.ej. sistema del complemento) y células fagocíticas profesionales (neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas), que internalizan (fagocitan) y digieren los patógenos. Además, otros tipos celulares como los mastocitos, basófilos, eosinófilos y células NK (*Natural Killer*) ejecutan diferentes funciones para eliminar los agentes agresores. Como parte de la actividad del sistema inmunitario se establece una respuesta inflamatoria, una secuencia de eventos compleja que tiene como finalidad la creación de un entorno adecuado para la eliminación de patógenos. Esta respuesta es iniciada por el sistema inmunitario innato y continuada por el sistema inmunitario adaptativo. Las células fagocíticas ejercen de puente entre el sistema innato y el adaptativo, ya que tienen la capacidad de digerir los patógenos fagocitados, procesarlos y presentar sus antígenos al sistema adaptativo, que se activará y actuará específicamente y con elevada eficacia contra el agente agresor.

El sistema inmunitario adaptativo, activado por el sistema inmunitario innato, reconoce y “recuerda” detalles moleculares específicos y monta una respuesta más potente y rápida cada vez que una molécula extraña está presente en el organismo. Por eso se le llama adaptativo, pues el sistema inmunitario se prepara (genera una memoria de la inmunidad) para futuros encuentros con un mismo patógeno. La respuesta inmunitaria adaptativa es llevada a cabo por los linfocitos T y los linfocitos B. Los linfocitos T participan en la respuesta celular mientras que los linfocitos B participan en la respuesta humoral. Ambos tipos celulares tienen receptores de superficie que reconocen antígenos de forma específica (Alberts et al., 2014).

Los linfocitos T, a través de su receptor TCR (*T Cell Receptor*), reconocen antígenos procesados por células presentadoras de antígenos (APC) y presentados mediante los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC). Las principales APCs son las células dendríticas y los linfocitos B. Hay dos tipos principales de linfocitos T: linfocitos T citotóxicos (T_c) y linfocitos T colaboradores (*T helper*, T_h). Los linfocitos T_c reconocen antígenos presentados a través del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MHCI) por cualquier tipo de célula, y son capaces de eliminar células infectadas, mientras que los linfocitos T_h reconocen antígenos presentados a través de MHC de tipo II (MHCII) por células presentadoras de antígeno (APC), y su función principal es producir mediadores inflamatorios (p.ej. citoquinas) para dirigir la respuesta inmunitaria.

Los linfocitos B pueden reconocer antígenos a través de su receptor de membrana BCR (*B Cell Receptor*), formado por una inmunoglobulina, sin la necesidad de que el antígeno sea presentado por un MHC. Una vez

reconocido el antígeno, y en presencia de mediadores inflamatorios secretados por los linfocitos T_h , los linfocitos B se diferencian a células efectoras, llamadas células plasmáticas, que producen anticuerpos específicos contra el antígeno en cuestión. Estos anticuerpos reconocerán y se unirán al patógeno, facilitando su fagocitosis por las células del sistema inmunitario innato, y activarán la cascada del complemento (Owen et al., 2012).

El tipo de agresión y el contexto en el que las APC contacten con el antígeno, determinará la naturaleza de la respuesta inmunitaria. Los linfocitos T_h polarizan principalmente en dos subpoblaciones, T_h1 y T_h2 , y en menor medida en una tercera subpoblación, T_h17 , que difieren en el tipo de citoquinas que producen cuando son estimuladas. Esta polarización dependerá de las señales derivadas de las APC, que a su vez dependerán del tipo de agente agresor.

Los linfocitos $Th1$ son clave en la respuesta contra infecciones víricas y contra bacterias intracelulares. Son inducidos principalmente por la interleuquina 12 (IL-12) y la IL-2 y se caracterizan por la producción de la citoquina interferón gamma ($IFN\gamma$). En cambio, los linfocitos T_h2 intervienen en la respuesta contra parásitos extracelulares, incluyendo platelmintos. Son inducidos por la IL-4 y se caracterizan principalmente por la producción de IL-4 e IL-13 (Annunziato et al., 2015). Los linfocitos $Th17$ se caracterizan por la producción de IL-17 y ejercen funciones reguladoras a parte de mediar respuestas contra bacterias extracelulares y hongos (Muranskiet al., 2013).

Para coordinar todos los elementos que participan en la respuesta inmunitaria, las células del sistema inmunitario producen mediadores inflamatorios que incluyen las citoquinas ya mencionadas, factores de

crecimiento y proteínas. En las fases iniciales de la respuesta inflamatoria, las células del sistema inmunitario innato producen citoquinas pro-inflamatorias (p.ej. IL-1, TNF α [*Tumor Necrosis Factor alpha*], IL-6) que son reconocidas por receptores específicos de membrana y activan cascadas de señalización que regulan la actividad de factores de transcripción, como NF κ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) o AP1, (*Activated protein 1*), que modulan las funciones efectoras de las células del sistema inmunitario. En las fases finales de la respuesta inflamatoria, el sistema inmunitario produce citoquinas como la IL-4, IL-13, IL-10 o TGF β que activan funciones de remodelación y reparación tisular, para reconstituir aquellos tejidos afectados durante la respuesta inflamatoria (Turner et al., 2014).

1.2 Inflamación asociada al cáncer

Hoy en día sabemos que la inflamación participa en todas las etapas del desarrollo tumoral; iniciación, progresión y metástasis. Mantovani y colaboradores describen dos vías mediante las que se establece la inflamación asociada al cáncer. Una vía intrínseca en la que las alteraciones genéticas sufridas por las propias células tumorales conducen a la expresión anómala de moléculas típicas de la respuesta inflamatoria, como la citoquina IL-1 β ; y una vía extrínseca mediada por condiciones inflamatorias exógenas, por ejemplo una infección crónica en regiones de riesgo (p. ej. hígado). Ambas situaciones conducen a la activación de factores de transcripción como NF κ B en las células tumorales y, por lo tanto, a la producción de más mediadores pro-inflamatorios como citoquinas, quimiocinas o prostaglandinas, que reclutan y activan células del sistema inmunitario, principalmente células mieloides,

estableciendo así un microambiente inflamatorio permanente en el tumor (Mantovani et al., 2008).

En este microambiente, un gran número de mediadores pro-inflamatorios, tales como $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-8, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), remodeladores de la matriz extracelular (*Matrix Metalloproteinases* [MMP9, MMP1]), integrinas (*Vascular Cell Adhesion 1* [VCAM1]), etc, juegan un papel crítico en la inducción de la proliferación, la supresión de la apoptosis, inducción de la angiogénesis o la migración celular, lo que finalmente ayuda a sostener el crecimiento tumoral y su progresión y, eventualmente, la metástasis en tejidos secundarios (Fernandes et al., 2015).

Por otro lado, también hay elementos celulares del sistema inmunitario que juegan un papel anti-tumoral. En fases iniciales, el infiltrado tumoral leucocitario puede ser escaso pero eventualmente puede contener células NK. Las células NK pueden reconocer las células tumorales a través de sus receptores NCRs (*Natural Cytotoxicity Receptors*) que detectan la expresión alterada de sus ligandos en la superficie de las células tumorales. Además, la regulación negativa o directamente, falta de expresión de la molécula MHC de clase I en la célula tumoral puede disparar la activación citolítica de las NK al reducirse las señales inhibitoras a través de MHCI-KIR (*Killer Inhibitor Receptors*) (Dahlberg et al., 2015). Además, la inmunidad anti-tumoral puede ser llevada a cabo por los linfocitos T. Para que esta inmunidad anti-tumoral sea llevada a cabo, el primer paso será la liberación de neo-antígenos tumorales derivados de la oncogénesis, y su captura y procesado por parte de células dendríticas. Esta fase debe ir acompañada de señales que reduzcan la tolerancia periférica contra los antígenos tumorales, señales pro-inflamatorias liberadas por la muerte de células tumorales. Las células dendríticas

presentarán los antígenos a través de los complejos MHCI y MHCII a los linfocitos T lo que activará sus funciones efectoras específicas contra los antígenos cancerosos. La eficacia de esta respuesta inmunitaria vendrá determinada en gran parte por el balance crítico entre células T efectoras y células T reguladoras (Treg) ya que estas últimas ejercen funciones inmunosupresoras sobre las primeras. Finalmente, las células T efectoras viajarán e infiltrarán el tumor, reconocerán y se unirán a las células tumorales a través de la unión del receptor TCR a los antígenos presentados por el complejo MHCI en la superficie de estas células, y las eliminarán. Esto aumentará la liberación de antígenos tumorales para que la respuesta continúe (D. S. Chen & Mellman, 2013).

1.3 Metástasis y genes inflamatorios

La metástasis es la principal causa de muerte de pacientes con cáncer (Badalà et al., 2013). Es definida como el proceso en el que una célula maligna en un tumor primario, escapa del tejido y forma un tumor secundario en un órgano distante. Lejos de ser un proceso simple, la metástasis se puede esquematizar como una secuencia de etapas en la que una célula en un tumor primario tiene que invadir el tejido donde se localiza, acceder a la circulación sanguínea o linfática, sobrevivir en ella, llegar a un tejido secundario, extravasar y sobrevivir en este tejido y, finalmente, colonizarlo. Cada etapa supone una barrera que la célula tumoral es capaz de superar gracias a nuevas capacidades adquiridas por ella misma o inducidas por el estroma tumoral (Nguyen et al. 2009). En este sentido, al comparar los perfiles de expresión génica de algunos tumores metastáticos y tumores primarios, se ha determinado un patrón de expresión génica que los distingue. Además, individuos con un

tumor primario que expresa genes de este patrón, presentan un tiempo de supervivencia más corto, definiéndose así una firma genética de mal pronóstico para tumores primarios (Ramaswamy et al., 2003).

A parte de la virulencia metastática, el tropismo hacia ciertos tejidos también está determinado genéticamente. Ya a finales del siglo XIX se había observado que no es aleatorio el lugar donde se desarrolla un foco metastático sino que hay órganos más recurrentes que otros (Stephen Paget, 1889). Experimentalmente, diferentes colonias obtenidas a partir de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, muestran distinto tropismo hacia hueso o pulmón. Aunque en todas estas colonias la firma genética de mal pronóstico está presente y sin variaciones, cada una de ellas tiene un perfil de expresión específico en función del tejido que colonizan preferentemente (Minn, Kang, et al., 2005). Inyectando estas colonias en ratones inmunodeficientes y obteniendo muestras de los tumores metastáticos más virulentos, se han generado las líneas celulares BM-1833, LM2-4175 y BrM2a altamente metastáticas y con un tropismo muy específico hacia hueso, pulmón y cerebro respectivamente. Al realizar análisis masivo de expresión génica en estas células se ha podido definir un grupo de genes que están, o bien sobre-expresados o bien reprimidos, en comparación con la línea celular parental MDA-MB-231, y que determinan la especificidad y virulencia por estos tejidos determinados. Curiosamente un gran número de genes en estos perfiles génicos son mediadores inflamatorios tales como MMP1, MMP2, VCAM1, CXCL1 (*C-x-c motif ligand 1*), COX2 (*Cyclooxygenase*), IL13RA2 (*IL-13 Receptor alpha 2*), IL-11, o CXCR4 (*c-x-c chemokine receptor type 4*) entre otros (Kang et al., 2003; Minn et al., 2005; Bos et al., 2009). Las líneas metastáticas de pulmón y hueso (LM2-4175 y BM-1833, respectivamente) han sido utilizadas en este trabajo para estudiar los efectos de los LXR (ver capítulo 3

de la introducción) sobre el perfil de expresión génica asociado a metástasis de hueso y pulmón (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Perfil de expresión génica asociado a metástasis a pulmón. Se muestran los genes que conforman el perfil de expresión génica de las células LM2-4175 asociado a la metástasis hacia pulmón. La primera parte de la tabla muestra aquellos genes reprimidos en comparación con la línea parental MDA-MB-231, la segunda parte de la tabla muestra aquellos genes sobre-expresados en LM2-4175 en comparación con las MDA-MB-231 (adaptado de Minn, et al., 2005).

PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADO A METÁSTASIS A PULMÓN

Genes reprimidos	
Símbolo	Nombre
OLFML2A	olfactomedin-like 2A
NEDD9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9
CSF2RA	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)
MOCOS	molybdenum cofactor sulfurase
EPHX1	epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)
MBNL2	muscleblind-like 2 (Drosophila)
GSN	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)
MYH10	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle
ARNT2	aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2
RARRES3	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3
EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
MATN2	matrilin 2
LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E
HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
ASMTL	acetylserotonin O-methyltransferase-like
ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3
KIAA1199	KIAA1199
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
PARD6B	par-6 partitioning defective 6 homolog beta (C. elegans)

PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADO A METÁSTASIS A PULMÓN

Genes sobreexpresados	
Símbolo	Nombre
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2
KLRC1/2	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1/2
MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)
KYNU	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)
EREG	e piregulin
TNC	tenascin C (hexabrachion)
ISG20	interferon stimulated gene 20kDa
ALDH3A1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
LAPTM5	lysosomal-associated multispanning membrane protein-5
C10orf116	chromosome 10 open reading frame 116, adipose specific 2
ROBO1	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)
SPANXC	SPANX family, member C
ANGPTL4	angiopoietin-like 4
FSCN1	fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)
SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4
SPANXB1	SPANX family, member B1
COL6A1	collagen, type VI, alpha 1
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
STOM	stomatin
GPR153	G protein-coupled receptor 153
MAN1A1	mannosidase, alpha, class 1A, member 1
C14orf139	chromosome 14 open reading frame 139
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)
IGSF4	immunoglobulin superfamily, member 4
LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1
NR2F1	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1
EMP1	epithelial membrane protein 1
ID1	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein
CNOT2	CCR4-NOT transcription complex, subunit 2
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1

Tabla 2. Perfil de expresión génica asociado a metástasis a hueso. Se muestran los genes que conforman el perfil de expresión génica de las células BM-1833 asociado a metástasis hacia hueso. La primera parte de la tabla muestra aquellos genes reprimidos en comparación con la línea parental MDA-MB-231, la segunda parte de la tabla muestra aquellos genes sobre-expresados en BM-1833 en comparación con las MDA-MB-231 (Kang et al., 2003).

PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADO A METÁSTASIS A HUESO

Genes reprimidos	
Símbolo	Nombre
ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3
APM2	adipose specific 2
ARHGEF10	rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10
BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3
CAV2	caveolin 2
ChGn	chondroitin beta1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase
CLU	clusterin
COL5A1	collagen, type V, alpha 1
CTSB	cathepsin B
CX3CL1	human CX3C chemokine
CYP1B1	cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1
DDR1	discoidin domain receptor family, member 1
DLC1	deleted in liver cancer 1
FKBP11	FK506 binding protein precursor
FN1	fibronectin 1
FTH1	ferritin, heavy polypeptide 1
GALNAC4S-6ST	B cell RAG associated protein
GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible
GPRC5C	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member C
HFE	hemochromatosis
HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
HLA-DPB1	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
HLA-DRB3	major histocompatibility complex, class II, DR beta 3
IL15	interleukin 15
ITGB4	integrin, beta 4
KRT7	keratin 7
LAMB1	laminin, beta 1
N33	putative prostate cancer tumor suppressor
POMZP3	POM (POM121 rat homolog) and ZP3 fusion
PON2	paraoxonase 2
PPL	periplakin
RHBDL2	rhomboid, veinlet-like 2 (Drosophila)
S100A2	S100 calcium-binding protein A2
S100A3	S100 calcium-binding protein A3
SAA2	serum amyloid A2
SCAMP4	secretory carrier membrane protein 4
SCNN1A	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha
SEL1L3	suppressor Of Lin-12-Like Protein 3
SERPINA1	serine proteinase inhibitor, clade A, member 1
SOX4	SRY-box 4
SPANXB1	sperm protein associated with the nucleus, X chromosome, family member A1
TCAF1	TRPM8 Channel Associated Factor 1
TGFB1	transforming growth factor, beta-induced, 68kD
TMEM4	transmembrane protein 4
TNFAIP2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
TNKS	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase
TRB	T cell receptor beta locus
TUBA1	tubulin, alpha 1

PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADO A METÁSTASIS A HUESO

Genes sobre-expresados	
Símbolo	Nombre
ADAMTS1	a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 1
AOX1	aldehyde oxidase 1
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
CTGF	connective tissue growth factor
CXCR4	chemokine (C-X-C motif), receptor 4 (fusin)
DDX-10	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 10 (RNA helicase)
DUSP1	dual specificity phosphatase 1
ENDOGL1	endonuclease G-like 1
EST	G-2 and S-phase expressed 1, has homology to cytokine receptor-like factor 2
FGF5	fibroblast growth factor 5
FHL1	four and a half LIM domains 1
FST	folistatin
FYN	src/yes-related novel gene
H2AFL	H2A histone family, member L
H2AFO	histone family, member O
H2BFJ	H2B histone family, member J
IL11	interleukin 11
KHDRBS3	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3
MCAM	melanoma cell adhesion molecule
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
MMP1	matrix metalloproteinase 1
MRPS18B	mitochondrial ribosomal protein S18B
NAP1L3	nucleosome assembly protein 1-like 3
NCF2	neutrophil cytosolic factor 2 (65kD, chronic granulomatous disease, autosomal 2)
NEDD4L	ubiquitin-protein ligase NEDD4-like
PCTK2	PCTAIRE protein kinase 2
PFN2	profilin 2
PRG1	proteoglycan 1, secretory granule
PTK7	protein tyrosine kinase 7
RGC32	regulator of cell cycle 32
SAMD4A	sterile alpha motif domain containing 4A
SE57-1	CTCL tumor antigen se57-1
SIX2	sine oculis homeobox (Drosophila) homolog 2
SLC4A7	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7
SLC5A3	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3
SOS1	son of sevenless (Drosophila) homolog 1
SPG4	spastic paraplegia 4 (autosomal dominant; spastin)
ST3GALVI	alpha 2,3-sialyltransferase
STAT2	STAT induced STAT inhibitor-2

1.4 Macrófagos Asociados a Tumor (TAM)

Los macrófagos son células mieloides del sistema inmunitario innato que están presentes en cada tejido del cuerpo, donde ejercen funciones efectoras contra patógenos y realizan importantes funciones homeostáticas (Murray & Wynn, 2011).

Los macrófagos presentan un enorme rango de polarización fenotípica lo que se refleja en una gran plasticidad funcional. En uno de los extremos de este rango de polarización encontramos los macrófagos pro-inflamatorios, mientras que en el extremo opuesto encontramos los macrófagos activados alternativamente. Los macrófagos se diferencian al fenotipo pro-inflamatorio en presencia del lipopolisacárido bacteriano (LPS) o la citoquina IFN γ , y se caracterizan por una elevada producción de TNF α e IL-12 para activar linfocitos Th1 y células NK, producción de especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico a través de la enzima NOS2 (*Nitric Oxide Synthase*), que metaboliza arginina a óxido nítrico, elevada expresión de MHC de clase II, eficiente presentación antigénica y elevada capacidad para eliminar patógenos intracelulares. En el extremo opuesto, los macrófagos se activan alternativamente en presencia de IL-4 o IL-13, y entre otras cosas se caracterizan por una elevada expresión de receptores *scavenger*, una elevada capacidad fagocítica, inducción de la vía de la arginasa, que hidroliza la arginina a ornitina y urea, compitiendo con NOS2 por la disponibilidad de arginina, y elevada producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Suelen participar en respuestas mediadas por linfocitos Th2 ayudando a combatir parásitos extracelulares, así como en la fase resolutive de la inflamación, ejerciendo un papel fundamental como supresores inflamatorios y

moldeadores tisulares. Entre los macrófagos pro-inflamatorios y los alternativos, encontramos una gran variedad de subtipos de macrófagos que comparten características de ambos grupos y que son difícilmente catalogables en uno u otro grupo (G. Liu & Abraham, 2013).

Los tumores sólidos están altamente infiltrados por una población heterogénea de leucocitos y de entre estos, los macrófagos son el tipo más abundante. Aunque de entrada podríamos pensar que la presencia de macrófagos podría tener un efecto beneficioso para el paciente, se ha demostrado que hay una correlación entre la abundancia de macrófagos en el tumor y un mal pronóstico de la enfermedad (Campbell et al., 2011). Experimentalmente, la delección del gen *Csf1* (*Colony stimulating factor 1*) (esencial para la diferenciación de los macrófagos) en los ratones PyMT (*Polyoma middle T oncoprotein mouse*), que desarrollan tumores de mama, reduce drásticamente la infiltración de macrófagos en el tumor, frena la progresión tumoral e inhibe la metástasis a pulmón (Lin et al., 2001). También hay casos en los que los macrófagos ejercen un papel antitumoral. Por ejemplo, la inoculación de células tumorales en el sistema portal generan un crecimiento tumoral exacerbado en el hígado cuando, previamente, se han eliminado selectivamente las células de Kupffer, en comparación con animales control (Heuff et al., 1993). Sin embargo, las evidencias clínicas y experimentales nos indican que en la mayoría de casos, los macrófagos tumorales ejercen un papel pro-tumoral y pro-metastático (figura 2).

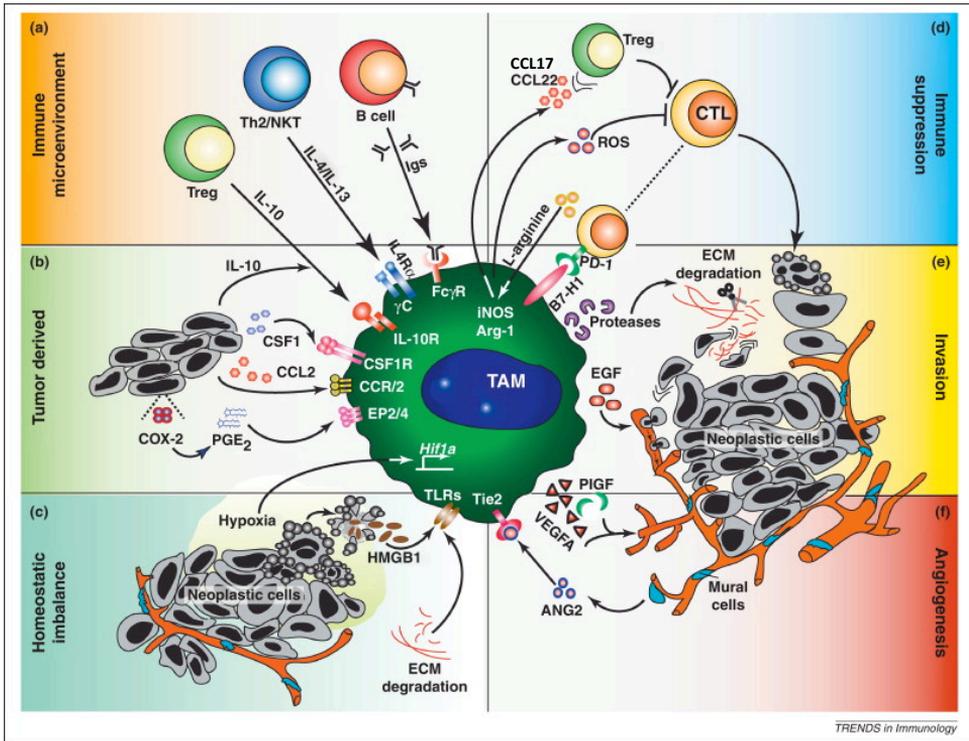


Figura 2. Funciones pro-tumorales de los TAM. Los TAM son una fuente de citoquinas y quimiocina en el microambiente tumoral. Estas moléculas y otros mediadores locales (p.ej. factores tisulares, proteasas) regulan el crecimiento tumoral, progresión e invasión, interacción con otros componentes del estroma, y la activación y orientación de la inmunidad adaptativa (Adaptado de Ruffell et al., 2012).

Los macrófagos asociados a tumor influyen prácticamente en cada etapa del desarrollo tumoral. Inicialmente, la producción de especies reactivas del oxígeno por parte de macrófagos con un perfil pro-inflamatorio, contribuyen a generar un ambiente mutagénico y promueven la proliferación en el estroma sub-epitelial. Durante la progresión del tumor, los macrófagos tumorales adquieren un fenotipo pro-tumoral, con una elevada capacidad

para inducir angiogénesis, moldear la matriz extracelular y estimular la migración celular, algo que el tumor aprovecha para promover la invasión y metástasis a tejidos secundarios. La adquisición del fenotipo característico de los TAM esta promovida por la célula tumoral a través de la secreción de citoquinas y otras señales (Biswas & Mantovani, 2010; Qian & Pollard, 2010; Mantovani & Sica, 2010).

Una de las características más relevantes adquiridas por los macrófagos tumorales es una elevada capacidad inmunosupresora. Mediante la expresión de diversas moléculas de superficie, los macrófagos tumorales pueden inhibir de manera directa la inmunidad contra el tumor. Por ejemplo, mediante la expresión de HLA-C (*Human Leucocyte Antigen C*), HLA-G y HLA-E, unida a membrana o de forma soluble, pueden interferir en la activación de células NK y de linfocitos T (Carosella et al., 2017). Los macrófagos tumorales también expresan los ligandos de los receptores PD-1 (*Programmed Cell Death Protein 1*) y CTLA4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*) (PD-L1 y B7-1, respectivamente) la activación de los cuales inhibe la señalización a través de los receptores TCR y BCR (Thibult, et al., 2012), inhibe la proliferación y activación de linfocitos T y la función citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ (*Cluster Differentiation 8*). Estos macrófagos, además, pueden inhibir la inmunidad contra el tumor de manera indirecta a través de la expresión de enzimas, citoquinas y quimiocinas. Enzimas como NOS2 o Arginasa 1, esta última considerada un marcador clásico de activación alternativa, consumen grandes cantidades de L-arginina en el microambiente tumoral. La L-arginina es un aminoácido esencial para el funcionamiento de los linfocitos T, y su depleción inhibe la re-expresión de la cadena CD3 ζ durante la activación del TCR (revisado en Noy & Pollard, 2014).

Otra vía mediante la cual los macrófagos ejercen inmunosupresión indirecta es a través del reclutamiento de linfocitos T reguladores (Treg) al microambiente tumoral. Los Treg son un subtipo de linfocitos T CD4⁺ caracterizados por una elevada expresión de la proteína de superficie CD25 y del factor de transcripción FoxP3 (*Forkhead box P3*). Estas células modulan el sistema inmunitario para mantener una tolerancia hacia antígenos propios y así prevenir enfermedades auto-inmunitarias (Whiteside, 2009). En el contexto tumoral, se ha observado que en pacientes con diversos tipos de cáncer, se produce una acumulación de Tregs en circulación que finalmente infiltran el tumor. Además, existe una correlación entre una mayor presencia de Treg y un peor pronóstico en la enfermedad (Wolf et al., 2003); (Deng et al., 2010). Una vez que han infiltrado el tumor, los Treg pueden suprimir la respuesta inmunitaria mediante la expresión de receptores de superficie como CTLA4 y PDL-1, o mediante la secreción de factores supresores solubles como TGFβ o IL-10 (Schmidt, Oberle, & Krammer, 2012). Los macrófagos tumorales tienen la capacidad de reclutar Tregs al ambiente tumoral mediante la secreción de las quimiocinas CCL17 (*CC chemokine ligand 17*) y CCL22 que actúan a través del receptor CCR4 (*CC chemokine receptor 4*) en la superficie de los linfocitos. A nivel clínico la presencia de CCL17 y CCL22 en el ambiente tumoral correlaciona con un aumento de la presencia de células Treg (Curiel et al., 2004); (Ishida & Ueda, 2006); (Mizukami et al., 2008). *In vitro*, podemos inducir la expresión de CCL17 y CCL22 en macrófagos activados por IL-4 y GM-CSF (*Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor*) (Martinez et al., 2009; Lacey et al., 2012).

Aunque generalmente consideramos que los macrófagos asociados a tumor presentan un fenotipo alternativo, la realidad es más compleja pues hay una gran variedad de subtipos de macrófagos dentro del tumor, cada uno de los

cuales ejerce un papel determinado en función de la zona del tumor que ocupe o del estadio del desarrollo tumoral en el que se encuentre (figura 3) (Qian & Pollard, 2010). En este contexto, se ha observado en ratón que diferentes subpoblaciones de macrófagos tumorales con diferente expresión de la molécula MHC de clase II (MHC II^{High} y MHC II^{Low}) muestran un distribución espacial marcadamente distinta. Curiosamente, las células MHC II^{Low} están enriquecidas en áreas hipóxicas del tumor, tienen un fenotipo alternativo y una elevada capacidad angiogénica *in vivo*. En contraste, los macrófagos MHC II^{High} se localizan en regiones normóxicas, presentan un fenotipo pro-inflamatorio y una reducida capacidad angiogénica. Ambas poblaciones tienen una baja capacidad de presentación antigénica y una elevada capacidad para suprimir la inmunidad. Además, expresan las quimiocinas CCL17 y CCL22, a pesar de que la población MHC II^{High} las expresa a niveles mucho más elevados (Movahedi et al., 2010). Se ha demostrado que el fenotipo de estas subpoblaciones esta influenciado por distintos factores de crecimiento. Así, mientras el fenotipo de la población MHC II^{Low} está moldeado por M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*), el factor de crecimiento GM-CSF no tiene ningún efecto sobre esta subpoblación pero en cambio afina el fenotipo de la subpoblación MHC II^{High} (Van Overmeire et al., 2016).

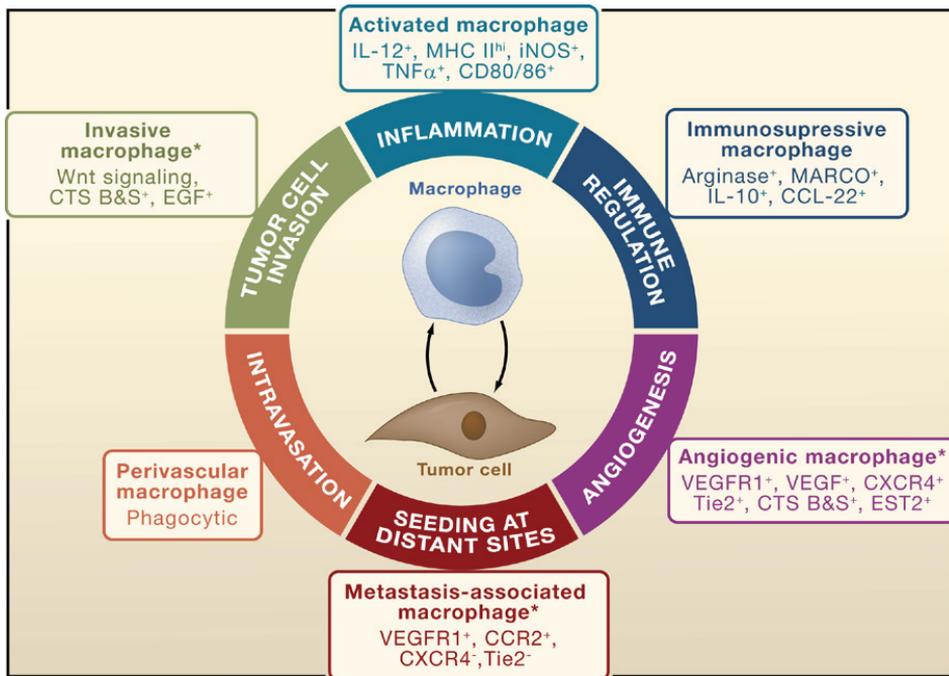


Figura 3. Distintos fenotipos de los macrófagos tumorales. Se muestran seis funciones pro-tumorales realizadas por los macrófagos. Cada una de estas funciones es realizada por un subtipo determinado de macrófago. Todos estos subtipos tienen en común la expresión de los marcadores CD11b, F4/80 y CFS-1R (*CFS-1 receptor*), así como la ausencia de Ly6G (*Lymphocyte Antigen 6 G*). Sin embargo, son educados por el microambiente para adquirir un fenotipo determinado para realizar las funciones determinadas como las mostradas (p.ej. invasión, angiogénesis, inmunosupresión). *poblaciones cuyo transcriptoma ha sido analizado (Qian & Pollard, 2010).

2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE IL-4 Y GM-CSF

Como hemos discutido en el capítulo anterior, el microambiente tumoral es determinante en el comportamiento del tumor durante su desarrollo. La abundancia o carencia de ciertas citoquinas regula el comportamiento y/o fenotipo de las células del infiltrado leucocitario, como es el caso de los macrófagos tumorales. Parte de este trabajo se ha centrado en el estudio de la regulación de las quimiocinas CCL17 y CCL22 en macrófagos activados por IL-4 o GM-CSF, dos citoquinas presentes en el microambiente tumoral y que juegan un papel relevante en la regulación de los macrófagos asociados a tumor.

2.1 Vía de señalización de IL-4

Aunque inicialmente hubo aproximaciones experimentales en las que la expresión de IL-4 en el tumor podía favorecer su rechazo, con el paso del tiempo se han acumulado sobradas evidencias de que esta es una citoquina promotora del tumor (Li et al., 2009).

Como ya se ha expuesto en el capítulo anterior, generalmente los macrófagos asociados a tumor muestran un fenotipo de activación alternativa. El fenotipo de estos macrófagos viene determinado, en parte, por la presencia de IL-4 en el microambiente tumoral, que es producida por células T CD4⁺ y por las propias células tumorales (Gocheva et al., 2010)(Coussens et al., 2013).

IL-4 es reconocida por la célula a través de la cadena α del receptor de IL-4 (IL-4R α), cadena que comparte con el receptor de IL-13. La unión de IL-4 a IL-4R α induce la heterodimerización de esta última con otra cadena, preferentemente con la cadena común γ (γ c) (figura 4) (Nelms et al., 1999; Miloux et al., 1997; Murata et al., 1998).

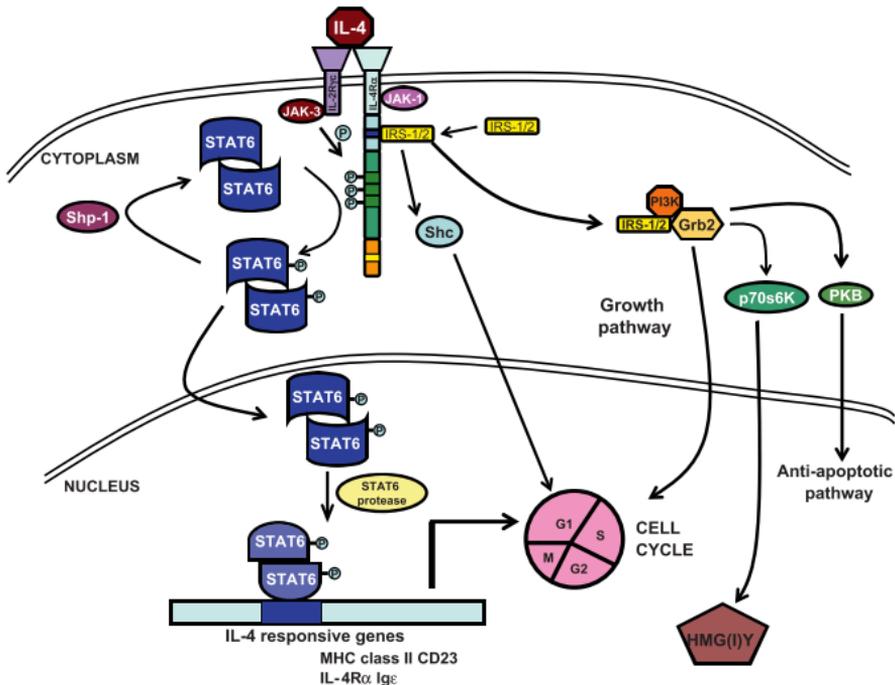


Figura 4. Señalización a través del receptor de IL-4. IL-4 media la heterodimerización de IL-4R α con la cadena IL-2R γ y activa miembros de la familia de quinasas JAK que fosforilan tirosinas en el dominio citoplásmico de IL-4R. Las tirosinas fosforiladas sirven como lugar de interacción con otras moléculas de señalización como STAT6. STAT6 se une al dominio fosforilado de IL-4R, es fosforilado por JAK quinasas y abandona el receptor en forma de homodímero con una segunda molécula de STAT6. Este complejo transloca al núcleo y se une a los promotores de los genes de respuesta a IL-4. Otra vía que se activa es la mediada por IRS-1/2 (*Insulin Receptor Substrate 1/2*), induciendo respuestas proliferativas a través de la activación de PI3K (*Phosphatidil Inositol 3 Kinase*) y RAS-MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (Varin & Gordon, 2009).

La unión agonista-receptor activa los miembros de la familia de las JAK (*Janus activated kinases*) quinasas JAK-1 y JAK-3, induciendo la fosforilación de residuos de tirosina en el dominio citoplasmático del receptor. Entonces, STAT6 (*Signal transducer and activator of transcription 6*) se une a los residuos fosforilados del receptor y es, a su vez, fosforilada en residuos de tirosina en su extremo c-terminal por las quinasas JAK activadas (Velazquez et al., 1992) (Darnell et al, 1997). Una vez fosforilado, STAT6 se separa del receptor y forma homodímeros mediante los residuos de tirosina fosforilados en su extremo c-terminal. Este complejo transloca hacia el núcleo y allí se une a los promotores de los genes de respuesta a IL-4 (Delphin & Stavnezer, 1995; Kaplan et al, 1996; Reichel et al., 1997; Ryan et al., 1996; Shimoda et al., 1996).

2.2 Vía de señalización de GM-CSF

En el contexto tumoral, GM-CSF induce inmunidad anti-tumoral en modelos animales, lo que ha llevado al desarrollo de vacunas anti-tumorales basadas en GM-CSF. Sin embargo, ensayos clínicos con este tipo de vacunas no han dado resultados positivos (Becher et al., 2016). A nivel de macrófagos tumorales, se ha visto que GM-CSF afina el fenotipo pro-inflamatorio de un subtipo de macrófagos localizados en regiones normóxicas del tumor (Van Overmeire et al., 2016), además se ha demostrado que células de cáncer de mama tipo mesenquimales inducen el fenotipo pro-tumoral de los macrófagos tumorales mediante la secreción de GM-CSF (Su et al., 2014). En ambos casos, un hecho característico es la inducción de CCL17 y CCL22 en los macrófagos tumorales.

El receptor de GM-CSF está formado por la cadena α (GM-CSFR α) y la cadena β común (β c) que comparte con los receptores de IL-3 e IL-5 (figura 5) (Sato et al, 1993). En la membrana existen complejos β c preformados que en ausencia de GM-CSF están disociados de GM-CSFR α . GM-CSF se une a GM-CSFR α con baja afinidad, lo que induce la dimerización de ésta última con la cadena β c. Esto lleva a la formación de un hexámero formado por dos moléculas de GM-CSF, dos GM-CSFR α y dos β c que aumenta la afinidad de la unión a GM-CSF. Posteriormente, dos hexámeros dimerizan, lo que permite la trans-activación de Jak2. Jak2 fosforila varios residuos de tirosina en la cadena β c que sirven de punto de anclaje para diversas proteínas que inducen sus respectivas cascadas de señalización (STATs, PI3K, MAPK y NF κ B), mediante las cuales GM-CSF es capaz de regular una gran variedad de funciones celulares, incluyendo apoptosis, ciclo celular, mielopoyesis, y múltiples funciones de activación y movilidad celular. De todas las cascadas activadas por GM-CSF, la vía JAK2-STAT5, es capaz de regular el perfil de diferenciación y el inflamatorio. (Hercus & Thomas, 2009; Laar et al., 2012).

2.3 El factor de transcripción IRF4

Los IRF (*Interferon Regulatory Factor*), son una familia de factores de transcripción que comprenden nueve miembros, IRF1-9, (Taniguchi et al, 2001) que ejecutan un amplio rango de funciones reguladoras del sistema inmunitario (Ikushima et al., 2013).

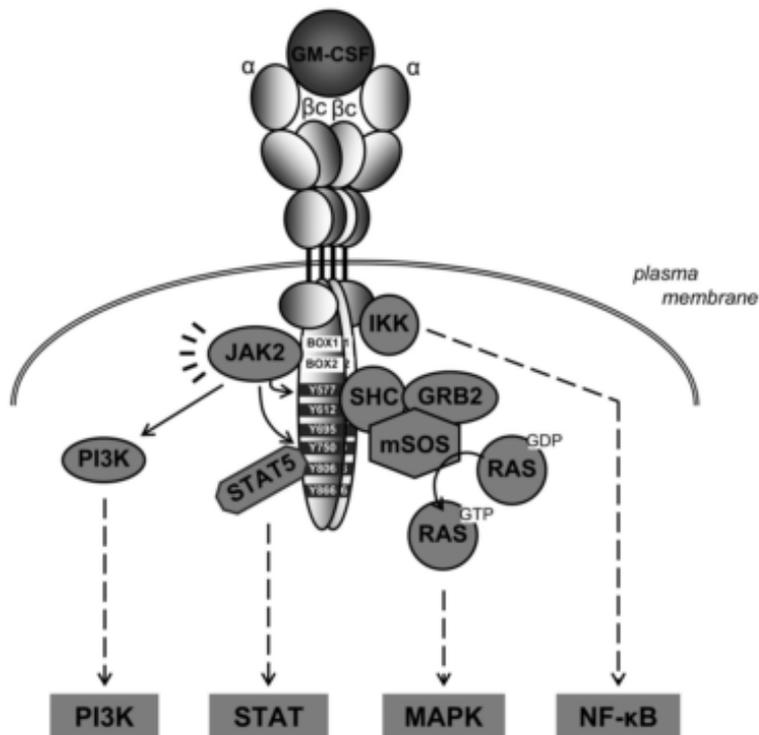


Figura 5. El receptor de GM-CSF. Iniciación de la transducción de señal de GM-CSF. En ausencia de GM-CSF, dímeros preformados βc así como cadenas de GM-CSFR α están presentes en la membrana. La unión de baja afinidad de GM-CSF a GM-CSFR α causa la asociación de ésta última con el dímero βc . Esto conduce a la formación de un hexámero de dos moléculas de GM-CSF, dos cadenas GM-CSFR α y dos cadenas βc , que permite la unión de alta afinidad entre GM-CSF y GM-CSFR α . Dos de estos hexámeros dimerizan lo que lleva las subunidades βc lo suficientemente cerca como para permitir la trans-activación de JAK2, iniciando así la subsiguiente señalización. JAK2 activada fosforila varios residuos de tirosina en βc que sirven de punto de anclaje para diversas proteínas participantes en la transducción de señales (STATs, MAPK, PI3K e IKK) (Laar et al., 2012).

Inicialmente, la expresión de IRF4 se restringió a la línea linfocítica, donde es esencial para el desarrollo de células Th2. Se demostró que durante este proceso, la rápida activación de STAT6 por IL-4 no explica la amplia gama de efectos biológicos de esta citoquina. Se observó que la activación de STAT6 por IL-4 induce la expresión de una primera oleada de genes de entre los que se encuentra IRF4, que posteriormente regula otro grupo de genes tardío, incluyendo la propia IL-4 (Gupta et al, 1999; Rengarajan et al., 2002; Lohoff et al., 2002). Posteriormente se ha demostrado que la expresión de IRF4 no está restringida al linaje linfocítico, sino que también se observa en macrófagos de ratón, en los que se induce por IL4, al igual que en monocitos humanos estimulados con IL-4 y GM-CSF. También se ha visto la inducción de IRF4 durante la diferenciación de monocitos a macrófagos y células dendríticas, siendo especialmente potente la inducción en estas últimas (Rosenbauer et al., 1999; Lehtonen et al., 2005; El Chartouni et al., 2010). Existe alguna evidencia de que la inducción de IRF4 por GM-CSF puede estar dirigida, en parte, por STAT5. Sin embargo no se ha podido demostrar que haya reclutamiento de STAT5 en el promotor de IRF4 lo que sugiere que STAT5 debe regular la expresión de un factor de transcripción que medie la inducción de IRF4 por GM-CSF (Esashi et al., 2008; Sebastián et al., 2008).

Para regular la expresión de sus genes diana, IRF4 reconoce y se une a regiones en el ADN con la secuencia 5'-GGAA_nGAAA-3', llamadas EICEs (*ETS-IRF consensus motif elements*). Sin embargo, esta unión al ADN es débil debido al dominio c-terminal de IRF4, que ejerce una función auto-inhibitoria. Mediante la unión cooperativa con otros factores de transcripción, IRF4 se libera de esta auto-inhibición y estabiliza su unión al ADN (Brass et al., 1996). Se ha demostrado que IRF4 actúa en cooperación con diversos factores de transcripción que incluyen PU.1, STAT3, AP1,

KLF4 (*Krupple Like Factor 4*), BATF (*Basic Leucine Zipper Transcription Factor*), NFAT1 (*Nuclear Factor of Activated T cell 1*) y NFAT2 (Kwon et al., 2009; P. Li et al., 2012; Rengarajan et al., 2002; Lee et al., 2009).

La convergencia de las vías de señalización de IL-4 y GM-CSF en IRF4, con las implicaciones que esto puede tener en la regulación de la biología de los macrófagos asociados a tumor, hacen de este factor de transcripción una diana farmacológica interesante en la regulación del microambiente tumoral.

3. RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares son una familia de factores de transcripción dependientes de agonista que participan en una gran diversidad de procesos fisiológicos, por ejemplo desarrollo, diferenciación celular, metabolismo, proliferación e inflamación, a través de la regulación, tanto positiva como negativa, de la expresión génica a nivel transcripcional. Los agonistas conocidos de los receptores nucleares normalmente son compuestos lipofílicos, incluyendo las hormonas esteroidea, tiroidea, el ácido retinoico, vitaminas y derivados y productos del metabolismo lipídico (Figura 7) (Burriss et al., 2013).

En general, los receptores nucleares comparten una estructura conservada (figura 6), con un dominio de activación en el extremo n-terminal (AF-1), un dominio de unión al ADN altamente conservado (DBD), una región bisagra y una región de unión al agonista en el extremo c-terminal (LBD) que

contiene un segundo dominio de activación (AF-2). El dominio LBD le confiere a cada receptor nuclear la especificidad por su agonista y contribuye a su homo- o hetero-dimerización. Dentro de esta región, el dominio AF-2 es el responsable del contacto entre el receptor nuclear y moléculas co-reguladoras de la transcripción. El dominio DBD permite la unión al ADN a través de elementos de respuesta específicos para cada receptor nuclear (Glass & Ogawa, 2006).

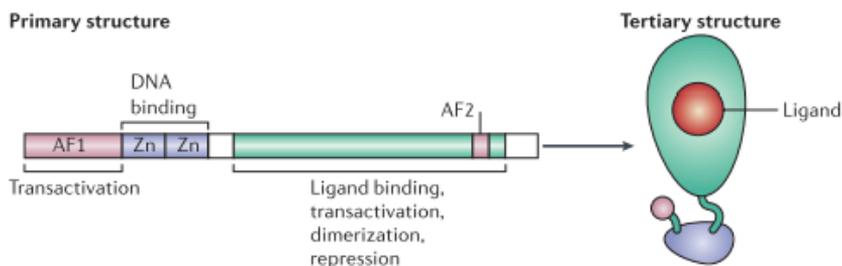


Figura 6. Estructura común de los receptores nucleares. La mayoría de los miembros de los receptores nucleares poseen una estructura común que consiste en un dominio activador localizado en extremo amino-terminal (AF-1), un dominio central de unión al ADN y un dominio C-terminal de unión al agonista (LBD). El LBD confiere la especificidad por el agonista y determina la interacción con moléculas co-reguladoras mediante cambios alostéricos en el dominio AF-2. LBD también contribuye a la dimerización con otros receptores nucleares (Glass & Ogawa, 2006).

	Endocrine Receptors	Adopted Orphan Receptors	Orphan Receptors
Ligands:	High-affinity, hormonal lipids	Low-affinity, dietary lipids	Unknown
	ER α, β PR AR GR MR RAR α, β, γ TR α, β VDR EcR	RXR α, β, γ PPAR α, β, γ LXR α, β PXR/SXR CAR SF-1 RVR α, β	LRH-1 DAX1 SHP TLX PNR NGFI-B α, β, γ ROR α, β, γ ERR α, β, γ GCNG TR 2,4 HNF-4 COUP-TF α, β, γ

Figura 7. La familia de los receptores nucleares. Los receptores nucleares están divididos en tres subfamilias. Primero, receptores endocrinos, constituido por receptores nucleares activados por hormonas: ER, receptor de estrógeno; PR, receptor de progesterona; AR, receptor de andrógenos; GR, receptor de glucocorticoides; MR receptor de mineralocorticoides; RAR receptor de ácido retinoico; TR, receptor de hormona tiroidea; VDR, receptor de vitamina D. Segundo, receptores “huérfanos” cuyo agonista aún no ha sido descubierto: LRH-1, *liver receptor homolog-1*; DAX-1, *dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*; SHP, *small heterodimer partner*; TLX, homólogo del receptor *Tailless* de drosófila; PNR, *photoreceptor cell-specific nuclear receptor*; NGFI-B, *nerve growth factor 1-B like receptor*; ROR, *RAR-related orphan receptor*; ERR, *estrogen related receptor*; GCNF, *germ cell nuclear factor*; TR 2,4, receptor testicular; HNF-4, *hepatocyte nuclear factor 4*; COUP-TF *COUP transcription factor*. Tercero, receptores “huérfanos adoptados”, que son receptores “huérfanos” cuyo agonista ya ha sido descubierto, tratándose en general de intermediarios lipídicos: RXR, *Retinoid X Receptor*; PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptor*; LXR, *Liver X Receptor*; FXR, *Farnesoid X Receptor*; PXR/SXR, *pregnane X receptor*; CAR, *constitutive adrosante receptor*; SF-1, *steroidogenic factor-1*; RVR, *Rev-erb* (revisado en Doan et al., 2017).

3.1 Liver X Receptors

Los *liver X receptors* (LXR) son factores de transcripción dependientes de agonista, miembros de la familia de los receptores nucleares que están involucrados en la regulación del metabolismo lipídico y glucídico, así como en el control de la inflamación y la proliferación (revisado en Pascual-García & Valledor, 2012). Los agonistas endógenos de los LXR son formas oxidadas del colesterol, llamadas oxisteroles, como el 25-hidroxicolesterol o el 27-hidroxicolesterol (Janowskiet al., 1996; Lehmann et al., 1997). Además se han desarrollado diversos agonistas sintéticos altamente específicos y con gran afinidad por los LXR. De estos, hay dos compuestos, el T1317 y el GW3965, que son habitualmente usados en la investigación de las funciones biológicas de los LXR (Collins et al., 2002; Schultz et al., 2000).

Los LXR están representados por dos miembros, α y β , expresados desde genes diferentes independientes con mas del 75% de homología en la secuencia de los dominios DBD y LBD. LXR α se expresa principalmente en macrófagos, hígado, tejido adiposo, intestino, pulmón, riñón, bazo y glandula mamaria, mientras que LXR β se expresa de manera ubicua (Repa et al., 2000; Svensson et al., 2004; Ali et al., 2004). Además, los agonistas de LXR inducen la expresión de LXR α en macrófagos humanos, generando un bucle de regulación positiva (Whitney et al., 2001; Laffitte et al., 2001). También se han observado diversas modificaciones post-traduccionales que pueden modular la actividad de los LXR, que incluyen acetilación, ubiquitinización, fosfolilación, sumoilación y O-gly-acilación. (Anthonisen et al., 2010; Chen, Bradley, Beaven, & Tontonoz, 2006; Ghisletti et al., 2007; Kim et al., 2009; X. Li et al., 2007; Torra et al., 2008; Venteclef et al, 2010; Watzlawik et al., 2006).

Para regular positivamente la expresión de sus genes diana, los LXR deben formar un heterodímero obligatorio con otro receptor nuclear, el *retinoid X receptor* o RXR, definido en la figura 7. RXR está representado por tres isoformas α , β y γ . El agonista endógeno de RXR es el ácido 9-cis retinoico (Laudet & Gronemeyer, 2002). El heterodímero LXR-RXR se une a elementos de respuestas llamados LXRE, ubicados en el promotor o en regiones enhancer de sus genes diana. Estos elementos están formados por dos repeticiones directas espaciadas por 4 nucleótidos (DR4) y que habitualmente siguen la secuencia consenso G/T/A)G(G/T)T(C/T)Annnn/C/A/T/)G(G/T)(T/G)CA, donde “n” significa un nucleótido al azar (Edwards et al, 2002).

En ausencia de agonistas, el heterodímero LXR-RXR se encuentra unido al ADN y asociado a moléculas co-represoras, como NCoR (*Nuclear Receptor Co-repressor*) o SMRT (*Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor*), bloqueándose la transcripción de los genes diana (Chen et al., 1995; Horlein et al., 1995). En presencia del agonista, LXR-RXR sufre un cambio conformacional que provoca la liberación del co-represor y permite el reclutamiento de moléculas co-activadoras, activándose la transcripción de los genes diana (figura 8) (Glass & Rosenfeld, 2000; Wagner et al., 2003).

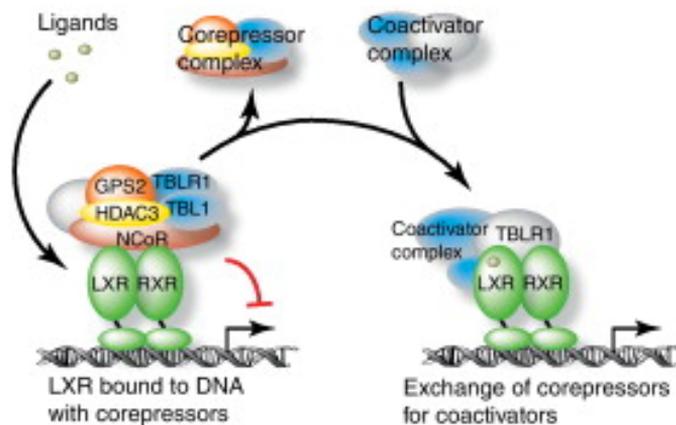


Figura 8. Mecanismo molecular de la activación de la transcripción por LXR. LXR se une a secuencias específicas en el ADN, llamadas LXRE, formando un heterodímero con RXR. La unión al agonista induce la disociación del complejo co-represor y el reclutamiento del complejo co-activador (Jakobsson et al., 2012).

3.2 Liver X Receptors en la regulación del metabolismo

Los LXR son ampliamente conocidos como sensores del colesterol y reguladores del metabolismo lipídico mediante la inducción de diversos genes diana. Cuando la concentración de colesterol en sangre aumenta, lo hace también la cantidad de colesterol oxidado, y por lo tanto, la formación de agonistas endógenos que activan los LXR. La activación de LXR induce la expresión de varios transportadores de esteroides de la familia de las *ATP-binding cassette* (ABC), como ABCA1 y ABCG1, con funciones esenciales en el transporte reverso de colesterol. Estos transportadores promueven el flujo de colesterol hacia las lipoproteínas HDL (*high density lipoprotein*), para que estas lo transporten al hígado y desde ahí sea excretado en forma de ácidos biliares en las heces (Repa et al., 2000; Venkateswaran et al., 2000). A la vez, los LXR

limitan la absorción de colesterol en el intestino mediante, por ejemplo, la inducción de los transportadores ABCG5 y ABCG8 (Baldan et al., 2008).

Además de promover el transporte reverso de colesterol, los LXR reducen la incorporación de colesterol en las células mediante la inducción del gen Idol (*inducible degrader of LDL receptor*), una ubiquitina ligasa que induce la degradación de diversos miembros de la familia del receptor de LDL (*low density lipoprotein*) (Zelcer et al., 2009). De esta manera, los LXR limitan la entrada de colesterol en la célula.

LXR también regula la lipogénesis mediante la inducción de SREBP1c (*sterol regulatory element-binding protein 1c*) y de ChREBP (*carbohydrate responsive element-binding protein*), dos de los principales reguladores de la síntesis de ácidos grasos, así como diversas enzimas implicadas en lipogénesis como FAS (*faty acid syntase*) , acetil-CoA carboxilasa y estearoil-CoA desaturasa 1 (Cha & Repa, 2007; DeBose-Boyd et al., 2001; Sean B. Joseph et al., 2002; Repa et al. & Mangelsdorf, 2000; Schultz et al., 2000; Talukdar et al. 2006; Wang et al., 2004).

De hecho, los agonistas de los LXR han mostrado efectos terapéuticos en modelos experimentales murinos de aterosclerosis (Joseph et al., 2002). Sin embargo, su actividad lipogénica ha limitado hasta el momento su uso terapéutico pues elevados niveles de triglicéridos son considerados un factor de riesgo en enfermedades cardiovasculares.

LXR también participa en la regulación del metabolismo de la glucosa. En el hígado, LXR reprime la expresión de genes implicados en la gluconeogénesis, incluyendo, PGC-1 α (*PPAR co-activator 1*), fosfoenolpiruvato carboxilasa y la

glucosa-6-fosfatasa. Los agonistas de LXR también inducen la expresión de glucoquinasa en el hígado, lo que promueve el catabolismo de glucosa, y el transportador de glucosa GLUT4 en tejido adiposo, que media la incorporación de glucosa (Laffitte et al., 2003). Finalmente, se ha demostrado en modelos de ratón que los agonistas de LXR aumentan la sensibilidad a la insulina (Dong et al., 2015).

3.3 Papel anti-inflamatorio de los Liver X Receptors

A parte del papel que juegan en la regulación del metabolismo, los LXR reprimen selectivamente la expresión de genes inflamatorios a través de diferentes mecanismos, incluyendo la transrepresión. Generalmente se considera que este proceso implica interacciones del receptor nuclear con otras proteínas unidas a los promotores de genes inflamatorios en vez de interactuar directamente con el ADN. En los últimos años se han descrito efectos anti-inflamatorios de los agonistas de LXR en diversos modelos experimentales (Pascual-García & Valledor, 2012).

En macrófagos, los agonistas de LXR transreprimen un grupo de genes que participan en la respuestas inflamatorias inducidas por LPS/TLR4 (*Toll Like Receptor 4*), TNF- α , IL1- β , ácido poliinosínico:policitidílico (vía TLR3) o por IFN- γ (figura 9) (Joseph et al., 2003; Ghisletti et al., 2007; Pascual-García et al., 2013). Ejemplos de genes inflamatorios reprimidos por los agonistas de LXR son COX2, NOS2, IL-6, MMP9, TNF- α o IL1- β entre otros (revisado en Pascual-García & Valledor, 2012). Además de la represión de genes inflamatorios, en células del sistema inmunitario, LXR β también inhibe la

expresión de las proteínas de fase aguda en el hígado (Blaschke et al., 2006; Venteclef et al., 2010).

Los efectos anti-inflamatorios de los LXR parecen diferir dependiendo del tipo celular y del estímulo inflamatorio concreto, y además, el mecanismo exacto de transrepresión aún no es comprendido en su totalidad. En ausencia de estímulos inflamatorios los genes inflamatorios están activamente reprimidos por un complejo co-represor que se une a sus promotores (Ogawa et al., 2004). Tras el estímulo inflamatorio, la transcripción de estos genes necesita un paso inicial para eliminar el complejo co-represor y así permitir el reclutamiento del complejo transcripcional que contiene la ARN polimerasa II (Ghisletti et al., 2009). Algunos de los componentes del complejo co-represor son susceptibles de sufrir ubiquitinización y degradación dependiente de proteasoma en respuesta a estímulos inflamatorios (Hoberg, Yeung, & Mayo, 2004). Es interesante que NCoR y SMRT forman parte del complejo co-represor que media la represión basal de genes inflamatorios en ausencia de estímulos. Existen algunas evidencias de que un posible mecanismo de transrepresión de la señal de LPS mediado por los receptores nucleares, incluyendo los LXR, es la interferencia con la eliminación de proteínas represoras (Ghisletti et al., 2007; Pascual et al., 2005).

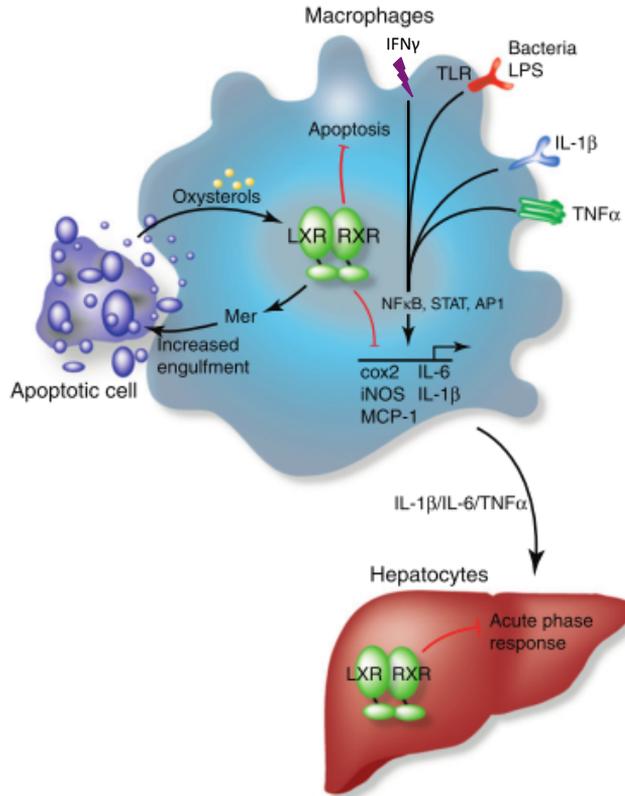


Figura 9. Papel de los LXR en el sistema inmunitario. Los LXR ejercen represión de señales pro-inflamatorias en células inmunitarias y en el hígado. En concreto, en macrófagos, los LXR transreprimen genes inflamatorios activados por LPS, TNF- α , IL1- β o IFN- γ . Además, LXR aumenta la fagocitosis de cuerpos apoptóticos (adaptado de Jakobsson et al., 2012).

Modificaciones post-traduccionales específicas en los LXR estarían involucradas en el mecanismo de transrepresión. En macrófagos y hepatocitos se ha descrito que LXR sufre sumoilación de manera ligando-dependiente y que esta modificación post-traducciona es necesaria para la transrepresión (Ghisletti et al., 2007; Venteclef et al., 2010). En macrófagos, por ejemplo, la sumoilación de LXR es necesaria para que el receptor nuclear

interfiera sobre la liberación del complejo co-represor del promotor de genes. La activación de LXR también interfiere con la vía de IFN- γ mediante la inhibición del reclutamiento de STAT1 al promotor de algunos genes inflamatorios. En este contexto, la sumoilación del receptor nuclear también es necesaria, al menos, para la represión sobre el promotor de NOS2 (figura 10) (Pascual-García et al., 2013).

También hay estudios recientes en los que la represión de genes inflamatorios mediada por LXR estaría provocada por la inducción de la transcripción de genes diana como ABCA1 i SREBP1c, vinculando su función reguladora del metabolismo con su papel anti-inflamatorio. En estos estudios, los LXR inhiben la señalización a través de los TLR 2, 4 y 9 mediante la inducción de ABCA1, que provoca cambios en la organización lipídica de la membrana que interfieren en el reclutamiento de MyD88 y TRAF6 (Ito et al., 2015). Por otro lado, SREBP1c regularia la expresión de enzimas encargadas de la síntesis de ácidos grasos anti-inflamatorios (Oishi et al., 2016).

Dado su papel anti-inflamatorio, los LXR son una potencial diana terapéutica a tener en cuenta a la hora de diseñar estrategias farmacológicas para atacar la inflamación asociada al cáncer.

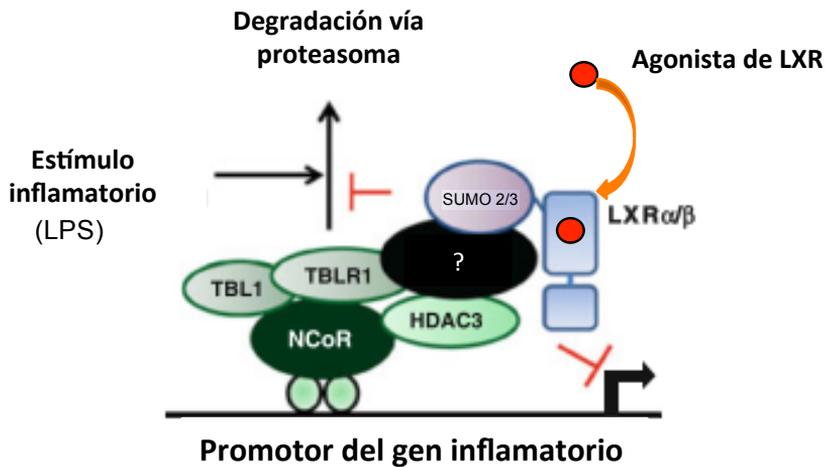


Figura 10. Mecanismo de transrepresión de genes inflamatorios mediado por LXR. Los genes inflamatorios, en general, están basalmente reprimidos por complejos co-represores en ausencia de estímulos inflamatorios. Estos complejos típicamente contienen NCoR o SMRT, TBL1 (*transducin (beta)-like 1 X-linked*), TBLR1 (*TBL1-related protein*) y la deacetilasa de histonas 3 (HDAC3). La inducción de la transcripción mediada por la señal inflamatoria (por ejemplo, LPS) necesita la previa liberación del complejo co-represor. La sumoilación de LXR en presencia de su agonista, previene la liberación del complejo co-represor del promotor, inhibiéndose la transactivación de la transcripción. La molécula que interacciona con LXR sumoilado, varía en función del tipo celular (p.ej. GPS2 en hígado y CORO2A en macrófagos) (Figura adaptada de Pascual-García & Valledor, 2012).

3.4 LXR en la regulación de otras funciones del sistema inmunitario

Aparte de su papel en la represión de genes inflamatorios, los LXR regulan positivamente la expresión de otros genes importantes en la actividad del sistema inmunitario.

Se ha demostrado que los LXR protegen a los macrófagos de la apoptosis inducida por la infección de varios patógenos, incluyendo *Listeria monocytogenes* (Joseph et al., 2004), *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*, así como de la apoptosis inducida por diversas formas de estrés celular, como la privación de factores de crecimiento (Valledor et al., 2004). Estos efectos se relacionaron con la represión de diversos miembros de la familia de las caspasas y otros factores pro-apoptóticos, y con la inducción del gen AIM (*Apoptosis inhibitor secreted by macrophages*), diana específica de LXR α , y de los genes anti-apoptóticos Bcl2l1 y NAIP (*Neural Apoptosis Inhibitory Protein*) (Sean B. Joseph et al., 2004; Valledor et al., 2004).

Otros estudios, han demostrado el papel de LXR en la regulación positiva de la fagocitosis de células apoptóticas (figura 9). Hace años se observó que la expresión de ABCA1 favorece la formación de fagosomas mediante la modificación de la composición de fosfolípidos en la membrana (Hamon et al., 2000). Posteriormente, se identificó Mertk (*c-Mer Tyrosine Kinase*) como una diana directa de LXR (A-Gonzalez et al., 2009). Mertk es miembro de la familia de receptores tirosina kinasa MER/AXL/TYRO3 que actúa como receptor de Gas6, una proteína que se une a la membrana de las células apoptóticas, favoreciendo la fagocitosis y eliminación de estas células (Scott et al., 2001). Además, se ha observado que la fagocitosis de células

apoptóticas activa los LXR, con lo que las propias células apoptóticas estarían promoviendo su eliminación (mediante la inducción de ABCA1 y MertK) (A-Gonzalez et al., 2009).

Finalmente, estudios recientes han descrito una vía mediante la cual la activación de los LXR limita la infección de macrófagos por *Salmonella Typhimurium*. LXR induce la expresión del ectoenzima CD38, cuya actividad se traduce en una reducción de los niveles intracelulares de NAD. Estos cambios metabólicos limitan la capacidad de la bacteria para invadir al macrófago (Matalonga et al., 2017).

3.5 LXR en el control de la proliferación

Diversos investigadores han descrito la capacidad de los LXR para ejercer funciones anti-proliferativas en diversos tipos celulares, incluyendo células primarias del sistema inmunitario y líneas celulares tumorales (Barba et al., 2009; Chuu et al., 2007; Pascual-García et al., 2011; Vedin et al., 2009). Los mecanismos que median los efectos anti-proliferativos de los LXR son variados en función del tipo celular. En linfocitos T, la inhibición de la proliferación se daría mediante la reducción de colesterol intracelular a través de un mecanismo dependiente de la inducción de ABCG1 (Bensinger et al., 2008). Por el contrario, los LXR inhiben la proliferación en macrófagos de manera independiente a ABCG1. En estos estudios, los agonistas de LXR ejercen efectos anti-proliferativos en un modelo *in vivo* de peritonitis inducida por concanavalina-A. Los análisis *in vitro* demostraron que en macrófagos, los agonistas de LXR inducen cambios en los niveles de proteína de miembros de la familia de las ciclinas y de las ciclinas dependientes de kinasa (figura 11)

(Pascual-García et al., 2011). Otros estudios realizados en osteoclastos demostraron que el factor de transcripción MAFB (*V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*) es necesario para regular la proliferación en este tipo celular. Los osteoclastos derivados de ratones con una deficiente expresión de MAFB mostraron una mayor capacidad proliferativa comparada con células que expresan niveles normales de MAFB. Curiosamente, este factor de transcripción es inducido por los agonistas de LXR a través de la inducción previa de SREBP1c (Menéndez-Gutiérrez et al., 2015).

Por otro lado, los LXR también inhiben la proliferación de una gran variedad de líneas tumorales de múltiples tejidos, incluyendo próstata, mama, hígado, pulmón, cérvix, epidermis, melanoma, hueso, carcinoma escamoso y leucemia de células T (Chuu et al., 2010). A pesar de la variedad de mecanismos implicados en la capacidad anti-proliferativa de los LXR, la inhibición de la expresión de la ubiquitina ligasa SKP2 (*S-Phase Kinase associate Protein 2*), parece ser una vía recurrente en varias de estas líneas tumorales como LNCaP (próstata), PC-3 (próstata), H1299 (pulmón), MCF-7 (mama), HepG2 (hígado) y HeLa (cérvix) (Chuu et al, 2010; Chuu et al., 2007). La actividad de SKP2 resulta en la ubiquitinación del inhibidor del ciclo celular p27/Kip1, que se encarga de parar el ciclo celular en la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo (Carrano et al., 1999). La ubiquitinación de p27/Kip1 supone la degradación de esta proteína a través del proteasoma, reduciendo así la capacidad de la misma de controlar negativamente el ciclo celular. Por tanto, la disminución de la expresión de Skp2 mediada por LXR resulta en un incremento en la vida media de p27 y un mayor control negativo de la progresión a través del ciclo celular.

De los muchos tipos de cáncer en los que LXR parecen tener un papel antitumoral relevante, son interesantes los resultados obtenidos en líneas tumorales de cáncer de mama (Vedin et al., 2009). En este trabajo la capacidad proliferativa de las líneas celulares MCF7 y T47D se ve reducida por los agonistas de LXR, mientras que en las líneas MB-MDA-231 y SK-BR3 los agonistas tienen pocos o nulos efectos sobre la proliferación. Curiosamente, las líneas MCF7 y T47D expresan en el receptor de estrógenos ($ER\alpha$) mientras que MB-MDA-231 y SK-BR3 son negativas para $ER\alpha$. Además, la presencia de un inhibidor de $ER\alpha$ reduce los efectos anti-proliferativos de los agonistas de LXR. En estas células, los efectos anti-tumorales de los LXR están mediados por la represión tanto de SKP2, como de las ciclinas A2 y D1.

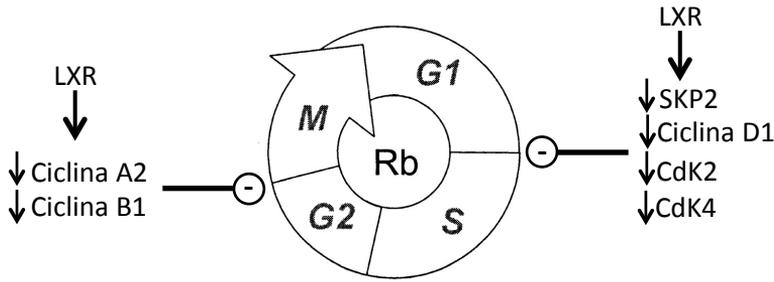


Figura 11. Moléculas del ciclo celular afectadas por los LXR. Los LXR inhiben la progresión del ciclo celular a través de la represión de diversas moléculas reguladoras del ciclo. En macrófagos reducen la expresión proteica de las ciclinas D1 y B1 y de las CDK2 y 4. En células de cáncer de mama ER positivas reprimen la expresión de las ciclinas D1 y A2, y en múltiples líneas tumorales aumentan los niveles de p27 a través de la represión de SKP2 (Pascual-García et al., 2011; Vedin et al., 2009; Chuu & Lin, 2010).

In vivo, los efectos anti-tumorales de los LXR han generado resultados contrapuestos dependiendo del modelo utilizado. En el modelo de ratón de cáncer de mama MMTV-PyMT, el tratamiento con el agonista de LXR GW3965 reduce el volumen del tumor primario, pero exacerba la formación de focos metastáticos en el pulmón (Nelson et al., 2013). En cambio, estudios en melanoma revelan que el tratamiento con GW3965 reduce tanto el crecimiento tumoral primario como la formación de metástasis a través de un mecanismo que implica la inducción de ApoE (*Apolipoprotein E*) (Pencheva et al., 2014). Finalmente, estudios realizados con células tumorales humanas y de ratón (RMA, B16, LOVO, MR255 y MSR3) sugirieron un papel pro-tumoral de los LXR. En estos estudios se propuso que los tumores producen ligandos de LXR, y que la activación del receptor nuclear reprime la expresión del receptor CCR7 en la superficie de las células dendríticas. Como consecuencia, se reduce la migración de las células dendríticas a los nódulos linfáticos y se

compromete la respuesta inmunológica anti-tumoral, aumentando el crecimiento del tumor. En estos estudios, en los animales en los que los tumores expresan la enzima SULT2B1b, que inactiva a los agonistas de LXR, se recupera la migración de células dendríticas hacia nódulos linfáticos y el sistema inmunitario es capaz de controlar el crecimiento del tumor (Villablanca et al., 2010).

4. HIPÓTESIS

En este trabajo queremos extender el análisis del papel de los LXR en la regulación de diferentes aspectos relacionados con la biología tumoral. Teniendo en cuenta los efectos anti-inflamatorios de los agonistas de LXR en diferentes modelos, y considerando que los LXR juegan un papel clave en la regulación de la biología del macrófago en diferentes contextos, nuestra hipótesis es que los LXR ejercen funciones importantes en la regulación del microambiente tumoral. Para ello hemos investigado, por un lado, si los LXR tienen un papel relevante en la regulación del perfil metastático de las líneas celulares BM-1833 con preferencia a hueso y LM2-4175 con preferencia a pulmón, y en su capacidad proliferativa, y por otro lado si los LXR ejercen algún papel relevante sobre la biología de los macrófagos asociados a tumor.

Objetivos

Objetivos

1. Estudio del papel de los *liver X receptors* sobre la proliferación de células tumorales
2. Estudio del papel de los *liver X receptors* sobre el perfil de expresión génica de células metastáticas.
3. Estudio del papel de los *liver X receptors* sobre la expresión de quimiocinas en macrófagos asociados a tumor.

Materiales y Métodos

1. Proteínas recombinantes y agonistas

Las proteínas recombinantes GM-CSF e IL-4 fueron adquiridas en PreproTech (Roky Hill, NJ, EE.UU.). Como agonistas sintéticos de LXR se utilizaron T101317 de Cayman Europa (Tallin, Estonia) y GW3965 de GlaxoSmithKline (Research Triangle Park, North Carolina, EE.UU.).

2. Animales

Los ratones C57BL/6 fueron adquiridos de Harlan. Los ratones deficientes en LXR (Repa et al., 2000) fueron cedidos por el Dr. David Mangelsdorf (UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX, EE.UU.). Estos ratones se encuentran en entorno genético C57BL/6 por más de diez generaciones. Las médulas óseas procedentes de ratones deficientes en IRF4 fueron cedidas por Magdalena Huber (Institute for Medical Microbiology and Hospital Hygiene, University of Marburg, Marburg, Alemania). Las médulas óseas procedentes de ratones deficientes en JunD ó JunB fueron cedidas por Erin Wagner, (CNIO, Madrid, España).

Todos los protocolos que requieren manipulación animal fueron aprobados por los comités éticos de experimentación con animales del Parc Científic de Barcelona y de la Universidad de Barcelona.

3. Cultivos celulares

Las líneas celulares BM-1833 y LM-4175 fueron cedidas por el Dr. Joan Massagué (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, EE.UU). Se mantuvieron en medio DMEM (BioWest, Nuaille, Francia) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FCS)(Sigma) inactivado por calor y un 1 % de penicilina/estreptomicina (BioWest, Nuaille, Francia), a 37 °C y 5 % de CO₂.

Los macrófagos derivados de médula ósea se obtuvieron a partir de médulas de ratones de entre 6 y 10 semanas de edad extraídas del fémur, tibia y húmero. Estas fueron diferenciadas a macrófagos con DMEM suplementado con 20 % de FCS inactivado por calor, 1 % de penicilina/estreptomicina y 30 % de medio condicionado L-Cell como fuente de M-CSF. El medio L-Cell fue obtenido a partir del sobrenadante de células L929 incubadas en DMEM suplementado con un 10 % de FCS inactivado por calor.

La línea celular de tumor de pulmón 3LLR de ratón C57BL/6 fue mantenida en medio RPMI con L-Glutamina (BioWest Nuaille, Francia) suplementada con 10 % de suero y 1 % de penicilina/estreptomicina.

4. Generación de transfectantes estables de las líneas LM-24175 y BM-1833 que expresan LXR α

La transfección de las células BM-1833 y LM-4175 con el plásmido pcDNA-3xFLAG-LXR α (cedido por Christopher K. Glass, UCSD, CA, EE.UU) se realizó en placas de cultivo celular de 60 mm al 50 % de confluencia utilizando el reactivo Superfect (Qiagen, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, 5 μ g de plásmido se incubaron con 30 μ l de Superfect y 150 μ l de DMEM sin suero ni antibióticos durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos de plásmido y reactivo. Esta solución se añadió a la placa de cultivo con 1 ml de medio completo y se incubó 2,5 h a 37 °C. Posteriormente se lavaron las células, se les añadió medio de cultivo fresco (con suero y antibióticos) y se incubaron a 37 °C durante 2 días. En este punto añadimos geneticina 500 μ g/ml (Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.) e incubamos durante 3 días para seleccionar positivamente las células que habían adquirido el plásmido, y con él, el gen de resistencia a neomicina. Las células resistentes fueron recolectadas, diluidas 1:10 y sembradas con geneticina 1 mg/ml durante días hasta que la formación de colonias es visible. Varios clones fueron amplificados de los cuales se analizó la expresión de 3xFLAG-LXR α mediante western blot utilizando un anticuerpo específico contra la marca Flag (anticuerpo monoclonal anti-Flag M2, Eastman Kodak). Se seleccionó un clon que expresara LXR α a un nivel intermedio (figura 12) y se usó para realizar los consiguientes experimentos. La expresión de LXR α y LXR β fue finalmente confirmada por PCR cuantitativa. A partir de este punto, los clones seleccionados fueron nombrados LM2-4175- LXR α y BM-1833- LXR α , respectivamente.

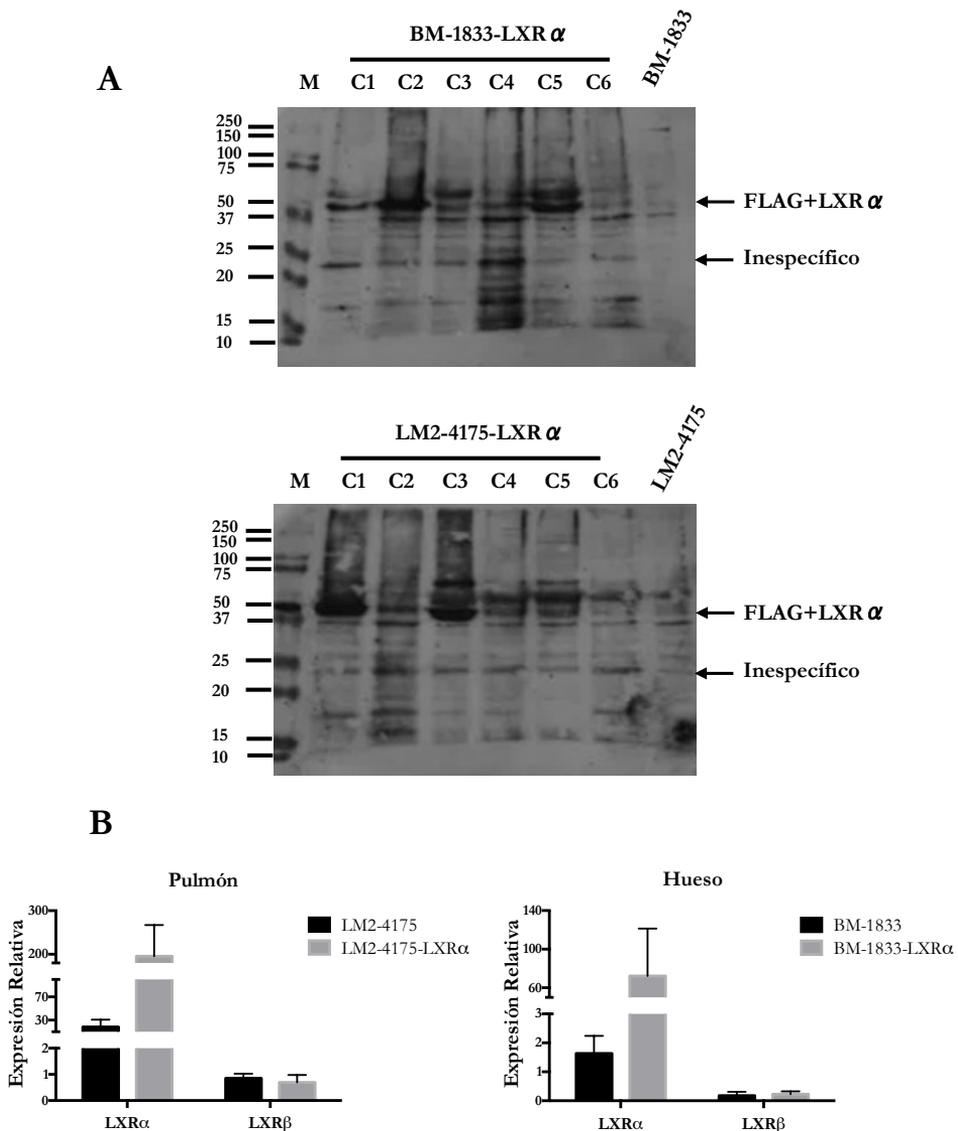


Figura 12. Obtención de clones de BM-1833 y LM2-4175 que expresan de forma estable FLAG-LXR α . A) Se extrajo la proteína total de 6 clones y la expresión de FLAG-LXR α fue analizada por western blot usando un anticuerpo específico contra FLAG. Se seleccionaron el clon 5 de BM-1833 y el clon 3 de LM2-4175. B) Se determinó mediante qPCR la expresión de LXR α y β en el clon 5 de BM-1833 y en el clon 3 de LM2-4175 y se comparó con la expresión de LXR α y β de BM-1833 y LM2-4175 sin transfectar. Se muestra el promedio de la expresión génica de entre 2 y 5 muestras.

5. Obtención de TAMs

En algunos estudios, 3×10^6 células de la línea celular 3LLR fueron inyectadas de manera subcutánea en el lomo de ratones C57BL/6 y se dejaron proliferar durante 15 días. Tras 2 semanas, los tumores de varios animales fueron extirpados y procesados conjuntamente para obtener una suspensión celular. Para ello, los tumores se trocearon mecánicamente con tijeras y se incubaron con un cóctel de enzimas digestivas (colagenasa tipo I 10 U/ml, colagenasa tipo IV 400 U/ml y DNAsa tipo I 30 U/ml, [Worthington, Lakewood, NJ, EE.UU.]) 25 minutos a 37°C. Los tumores digeridos fueron filtrados con una malla con poros de 70 μm de diámetro para generar la suspensión celular. Esta suspensión fue tratada con un tampón de lisis de eritrocitos antes de realizar un gradiente de ficoll (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá) para enriquecer la población de células leucocitarias. La suspensión celular fue diluida a una concentración de 10^7 células/ml e incubada con anticuerpos fluorescentes específicos para los marcadores de superficie CD11b, Ly6G, Ly6C y MHCII (tabla 3)(Movahedi et al. 2010). Para el aislamiento de TAMs separamos las poblaciones CD11b⁺, Ly6G⁻, Ly6C⁻ y MHCII^{Low} y CD11b⁺, Ly6G⁻, Ly6C⁻ y MHCII^{High}, a los que llamamos MHCII^{Low}TAM y MHCII^{High}TAM respectivamente (figura 13), mediante el separador celular FACSaria Fusion (BD Bioscience, San José, EE.UU). El cultivo *ex vivo* de estos macrófagos se realizó en medio RPMI con L-glutamina y hepes (BioWest) suplementado con piruvato sódico 10 mM (BioWest), aminoácidos no esenciales (1x) (BioWest) y 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) 3,7 nM.

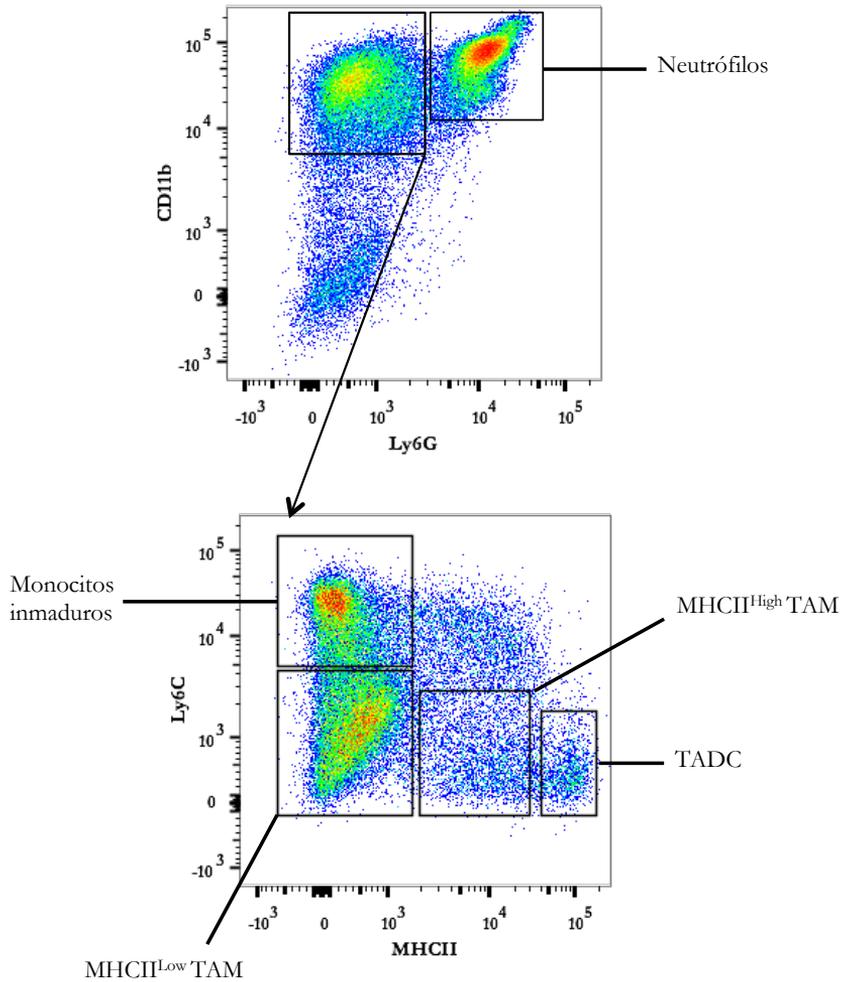


Figura 13. Poblaciones de células mieloides presentes en el microambiente tumoral. Ratones C57BL/6 fueron inyectados con 3×10^6 células 3LLR por vía subcutánea y se dejó al tumor desarrollarse durante 15 días. Posteriormente se extirpó el tumor y se obtuvo una suspensión celular que fue incubada con anticuerpos acoplados a fluoróforo contra los siguientes marcadores: CD11b, Ly6G, Ly6C y MCHII. Se analizaron las distintas poblaciones celulares mediante citometría de flujo. En los recuadros se indican las poblaciones mieloides ($CD11b^+$) analizadas: Neutrófilos ($CD11b^+ Ly6G^+$), Monocitos inmaduros ($CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^+ MHCII^{Low}$), $MHCII^{Low}$ TAM (*Tumor associated macrophage*) ($CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^- MHCII^{Low}$), $MHCII^{High}$ TAM ($CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^- MHCII^{High}$) TADC (*Tumor associated dendritic cell*) ($CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^- MHCII^{Bright}$).

Tabla 3. Anticuerpos unidos a fluoróforo utilizados en citometría y separación celular.

Anticuerpo	Fluoróforo	Marca	Clon
Anti-Ly6G	APC	BioRad	ER-MP20
Anti-MHCII	BV421	BD Bioscience	M5/114.15.2
Anti-CD11b	PE-Cyanine7	eBioscience	M1/70
Anti-Ly6G	PerCP/Cy5.5	Biologend	1A8

6. Extracción de ARN, generación de ADNc y PCR cuantitativa a tiempo real

Las células fueron lavadas con PBS y la extracción de ARN total se realizó con el reactivo TriReagent (Sigma-Aldrich) según las instrucciones del fabricante. Para la generación de ADNc, se realizó la transcripción reversa de 1 µg de ARN total utilizando el enzima M-MLV RNase (H-) Point Mutant (200 unidades) (Promega, Madison, WI), Oligo(dT)₁₅ (500 ng) (Biotools, España) y una mezcla de oligonucleótidos para PCR (0,5 mM) (Promega). El análisis de expresión génica se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Para ello, por cada reacción utilizamos 2 µl de ADNc diluido 1/8, primer forward y reverse 0,3 mM y Power SYBR Green diluido 1/2 (Applied Biosystems, Foster city, CA, EE.UU.) . El programa de PCR fue de 30 segundos a 95°C para la desnaturalización, 30 segundos a 60°C para la hibridación y 30 segundos a 72°C para la elongación. La especificidad de los primers fue comprobada mediante una curva de disociación. La secuencia de los primers utilizados se muestra en la tabla 4. La amplificación y monitorización se llevó a cabo con el termociclador ABI Prism 7900 HT

Sequence Detection System (Applied Biosystems). Los datos se muestran como expresión relativa de ARNm normalizados con la expresión del gen L14 para los genes de ratón y ciclofilina A para los genes humanos.

Tabla 4. Primers usados para el análisis de la expresión génica.

<i>Gen</i>	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
CASP1	5'-ATTTTCCGCAAGGTTTCGATTT-3'	5'-CTGCGCTCTACCATCTGGCT-3'
CTGF	5'-CTTGCGAAGCTGACCTGGAA-3'	5'-GCTCGGTATGTCTTCATGCTGG-3'
CXCL1	5'-GCCCAAACCGAAGTCATAGC-3'	5'-GAGGCAAGCTTCCGCC-3'
CXCR4	5'-AGGTAGCAAAGTGACGCCGA-3'	5'-AGATGCGGTGGCTACTGGAG-3'
CYCLOPHILIN A	5'-ACGGCTCCCAGTTCTTCATCAC-3'	5'-TATCCC GGCTGTCTGTCTTGGT-3'
EREG	5'-CCATCTTCTACAGGCAGTCCTC-3'	5'-AGTGTTCACATCGGACACCA-3'
FGF5	5'-TCCATGCAAGTGCCAAGTTCAC-3'	5'-ACATACCACTCCCGCCCTGTTT-3'
ID1	5'-GTATCTGCTTCGGGCITCCA-3'	5'-AAACAGAAATGGGCAAAGCGA-3'
IL-11	5'-GCTGCACCTGACACTTGACT-3'	5'-TAAGATCTGGCTTTGGAAAGGAC-3'
KNYU	5'-ATTTTGCCTGCTGGTGTCC-3'	5'-ACTCCGATCTCGCAGTTTAAAT-3'
LXR α	5'-CGCACTACATCTGCCACAGT-3'	5'-TCTTCAGGCGGATCTGTCT-3'
LXR β	5'-CTGCAGCACAGACTGGGTCA-3'	5'-TTGCGCTCTGTTCTCTTC-3'
MAFB	5'-CATAGAGAACGTGGCAGCA-3'	5'-GTGTGCCCAAGACAAAAGTT-3'
MMP1	5'-CGAATTTGCCGACAGAGATGAA-3'	5'-TCTAGGGAAGCCAAAGGAGCTG-3'
SKP2	5'-CATTTTCAGCCCTTTTCGTGT-3'	5'-GGGCAAATTCAGAGAATCCA-3'
SPANX1B	5'-GGCCACTGCGAAGATTCAA-3'	5'-CCTGCGGACACTGGATTGTT-3'
p21	5'-CCTCATCCCCTGTTCTCCTTT-3'	5'-GTACCACCCAGCGGACAAGT-3'
PMEPA1	5'-GCACAGTGTTCAGGCAACGG-3'	5'-AGATGGTGGGTGGCAGGTC-5'
TNC	5'-CACAGCCACGACAGAGGC-3'	5'-CACAGCCACGACAGAGGC-3'
VCAM1	5'-GCTGCTCAGATTGGAGACTCA-3'	5'-CGCTCAGAGGGCTGTCTATC-3'
<i>Arg1</i>	5'-TTGCGAGACGTAGACCCTGG-3'	5'-CAAAGCTCAGGTGAATCGGC-3'
<i>Cd17</i>	5'-TGCTTCTGGGGACTTTTCGTG-3'	5'-CATCCCTGGAACACTCCACT-3'
<i>Cd22</i>	5'-CCTTCTTGTCTGTGGCAATTCAG-3'	5'-CTCGGTTCTTGACGGTTATCA-3'
<i>Ifi4</i>	5'-ATTTGGAGCACAGAGAGGCTT-3'	5'-TGTAGGACATGACACCACC-3'
<i>Jmjd3</i>	5'-CTGGTTCACTTCGGCTCA-3'	5'-GGCCTGGTACTGTGCGTATT-3'
<i>L14</i>	5'-TCCCAGGCTGTTAACGCGGT-3'	5'-GCGCTGGCTGAATGCTCTG-3'
<i>Lxrα</i>	5'-CCTTCCCAAGGACTTCAGTTACAA-3'	5'-CATGGCTCTGGAGAACTCAAAGAT-3'
<i>Lxrβ</i>	5'-CATTGCGACTCCAGGACAAGA-3'	5'-CCCAGATCTCGGACAGCAAG-3'
<i>Mgl1</i>	5'-TGAGAAAGGCTTTAAGAAGTGGG-3'	5'-GACCACCTGTAGTGATGTGGG-3'
<i>Mrc1</i>	5'-GGTTCACCTGGAGTGTATGGTTC-3'	5'-GTGGATTGTCTTGTGGAGCAGG-3'
<i>Ym1</i>	5'-TGTCTGTTGAAGGAAATGCG-3'	5'-CGTCAATGATCTCTCTCTGT-3'

7. Análisis masivo de la expresión génica

El ARN total fue extraído utilizando TriReagent (Sigma-Aldrich). Las dianas de hibridación fueron preparadas a partir de 25 ng de ARN total, utilizando el sistema de amplificación isotermal SPIA Biotin System v2 (nuGEN Technologies, Inc., San Carlos, CA). 2,2 µg de ADNc fueron hibridados en cada array (GeneChip PrimeView Human Gene Expression Array) (Affimetrix, Santa Clara, CA, EE.UU.). Los arrays fueron escaneados en un GeneChip Scanner 3000 (Affimetrix). Se generaron archivos CEL a partir de archivos DAT utilizando GCOS software (Affimetrix). Las estimaciones de expresión fueron calculadas a partir de las intensidades de las sondas utilizando el algoritmo WPP (Auer et al., 2007). Las estimaciones de expresión generadas mediante WPP representan valores de log₂. El promedio de los valores de dos experimentos independientes fue utilizado para el análisis. El mapa cromático fue generado a través de CIMminer, programa desarrollado por Genomics and Bioinformatics Group, Laboratory of Molecular Pharmacology (LMP), center for Cancer Research, National Cancer Institute (EE.UU.).

8. Extracción de proteína y Western Blot

Las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y lisadas con una solución al 1 % de Triton X-100, 10 % Glicerol, 50 mM HEPES, pH 7,5, 250 mM de NaCl, 1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml iodacetamida, 1 mM PMSF, 1 mM de ortovanadato sódico. El material insoluble fue descartado por centrifugación. Los lisados celulares (entre 50 y 100 µg) fueron

calentados a 95°C en presencia de un tampón de carga (con SDS y β -mercaptoetanol), separados mediante SDS-PAGE y transferidos a una membrana de nitrocelulosa mediante electroforesis (Hybond-ECL; GE Healthcare Europe GmbH, Múnich, Alemania). Las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBS-0,1 % Tween 20 (TBS-T) suplementada con 5 % de leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente, incubadas con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Para la detección de FLAG utilizamos un anticuerpo primario anti-Flag (M2, Eastman Kodak) producido en ratón. Para la detección de p27 se utilizó un anticuerpo primario anti-p27 (C-19, Santa Cruz Biotechnologies) producido en conejo. Tras la incubación con el anticuerpo primario las membranas fueron sometidas a tres lavados con TBS-T. Como anticuerpo secundario utilizamos anti-IgG de ratón o conejo (Sigma-Aldrich) que incubamos durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, realizamos la detección mediante quimioluminiscencia utilizando ECL (GE Healthcare Europe) y exponiendo las membranas a films de rayos-X (Fujifilm Tokyo, Japón).

9. Análisis del contenido de ADN por citometría de flujo

Las células (5×10^6) fueron fijadas con etanol al 70 %, lavadas con PBS e incubadas con una solución de yoduro de propidio 5 $\mu\text{g/ml}$ suplementada con 0,05% de Triton X-100 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de RNasa A (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a 37°C. La tinción con yoduro de propidio de un mínimo de 15.000 células fue determinada con el citómetro Coulter Epics XL Beckman (Beckman Coulter, Fullerton, CA) y la distribución de núcleos en el ciclo

celular fue determinada con el programa multicycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA)(figura 14).

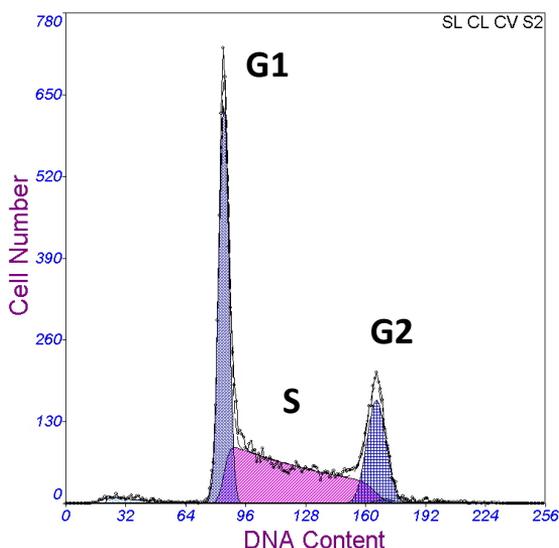


Figura 14. Análisis del ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. El yoduro de propidio tiñe el ADN y nos permite determinar el porcentaje de núcleos en las fases G1, S y G2 del ciclo celular en función de la cantidad de ADN presente en la célula.

10. Ensayos de proliferación

Para la determinación de la proliferación celular se utilizaron métodos directos e indirectos. Como método directo, 5×10^5 células fueron sembradas en placas de cultivo de 100 mm de diámetro con medio DMEM suplementado con 10 % de suero en presencia o ausencia de agonistas de LXR y se dejaron proliferar. Al cabo de 1, 3 y 7 días se recogieron mediante tripsinización y se realizaron un mínimo de 4 contajes por muestra usando un hematócrito, descartando las células no viables mediante tinción con azul de tripano (Sigma-Aldrich).

Como método indirecto se determino la incorporación de timidina- H^3 . Para ello, 100.000 células fueron incubadas en ausencia de suero durante 24h en presencia o ausencia de agonistas de LXR. Añadimos 10% de suero y L-glutamina (0,3 g/l) e incubamos otras 24 horas. Posteriormente realizamos un pulso con timidina- H^3 (1 μ Ci/ml; ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) durante 6 horas. Las células se fijaron con metanol al 70 %, se lavaron con ácido tricloroacético al 10 % y se lisaron con una solución de lisis (0,3M NaOH, 1 % SDS; Sigma-Aldrich). La radioactividad fue cuantificada en líquido de centelleo EcoLiteTM (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) utilizando un contador 1400 Tri-Carb Packard (GMI, Minneapolis, MN). Cada muestra se analizó por triplicado y los resultados se expresaron como la media de dpm (descomposiciones por minuto) +/- la SEM de tres experimentos.

11. Generación de construcciones con elementos de unión a IRF4

En este estudio se llevó a cabo un análisis bioinformático de datos de ChIP-Seq publicados por Ciofani y colaboradores (Ciofani et al., 2012) en los que se usaron anticuerpos contra IRF4 para determinar los sitios de unión de este factor de transcripción a lo largo del genoma durante la diferenciación de linfocitos Th17. Mediante este análisis, tres potenciales sitios de unión de IRF4 fueron identificados en regiones colindantes del gen que codifica para Ccl17. Estas regiones se encuentran fuera del promotor y representan potenciales enhancers. Para el análisis de la actividad de estos tres enhancers en macrófagos, clonamos estas regiones en el vector pGL3-promoter (Promega) (figura 15). Las tres regiones, llamadas *Ccl17 enhancer 1*, *Ccl17 enhancer 2* y *Ccl17 enhancer 3*, fueron amplificadas mediante PCR utilizando los

primers que se muestran en la Tabla 5. Para ello, 100 ng de ADN genómico de ratón fueron amplificados utilizando el preparado enzimático REDExtract-N-Amp PCR Ready Mix (Sigma-Aldrich) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y los fragmentos de interés fueron escindidos y purificados usando el kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Tabla 5. Primers utilizados en la generación de las construcciones Ccl17 enhancer 1, 2 y 3.

<i>Nombre</i>	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>
Ccl17 enhancer 1	5'-GGTCGGTACCGCAGATGAAGAAACCAAGGG-3'	5'-CGCCCTCGAGTTAACATTTAAAGAGAAAAGG-3'
Ccl17 enhancer 2	5'-GGCCGGTACCTAGCATCTTATTGCATAGCC-3'	5'-CGCCCTCGAGCCTTAATATACACCTACGGC-3'
Ccl17 enhancer 3	5'-ACATGACGACTGAAACATGG-3'	5'-AGCGTGCACTGATTCGTGGG-3'
pGL3 sequencing	5'-CTTTATGTTTTTGGCGTCTTC-3'	

El producto de PCR de Ccl17 enhancer 3 fue clonado en el vector pCR2.1 utilizando el TA Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad CA) siguiendo las indicaciones del fabricante. El producto de esta ligación fue amplificado mediante la transformación de bacterias *E.coli* competentes, la selección de colonias positivas resistentes a ampicilina, el crecimiento de colonias positivas en medio líquido con ampicilina y la purificación del plásmido mediante un protocolo de mini-prep. Para este último paso, 1 ml de crecimiento bacteriano fue resuspendido en tampón I (50mM glucosa, 25mM TrisHCL pH 6.0, 10mM EDTA) lisado durante 5 minutos en hielo con tampón II (10% SDS, NaOH 10N) y neutralizado durante 5 minutos en hielo con tampón III (75 mM acetato de potasio, 11,5% ácido acético). Para separar el plásmido se añadió un volumen 1:1 de cloropán (fenol 25:cloroformo

24:isoamil alcohol 1). Una vez recuperada la fracción acuosa, el ADN fue precipitado usando 2 volúmenes de etanol frío y resuspendido en agua miliQ. Se comprobó la presencia del inserto mediante la digestión con la enzima de restricción HindIII (Takara, Shiga, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante y analizando el patrón de bandas mediante electroforesis en gel de agarosa. Seleccionada una colonia positiva, se procedió al subclonaje del inserto en el vector pGL3 promoter (Promega). Para ello, primero se obtuvo ADN plasmídico de alta calidad mediante maxiprep utilizando el Kit Jet Star 2.0 (Genomed, St Louis, MO) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, 5 µg del vector pCR2.1-ccl17 enhancer 3 y 5 µg de pGL3 promoter fueron digeridos con las enzimas de restricción KpnI y XhoI. Las bandas correspondientes al inserto y al vector pGL3 promoter linearizado, fueron identificadas por electroforesis en gel de agarosa, purificadas con GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) y cuantificadas con Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE). La ligación se llevó a cabo con una proporción molar inserto:vector de 3:1 con 130 U de ligasa de ADN T4 (Promega) durante 18 horas a 14 °C. La transformación de bacterias con el producto de ligación, selección de clones y posterior obtención de plásmido a gran escala se realizó tal y como se ha descrito más arriba. Para la amplificación por PCR de las regiones *Ccl17 enhancer 1* y *Ccl17 enhancer 2* se utilizaron primers (tabla 5) que añaden dianas de restricción para KpnI y XhoI en los extremos del amplicón. Tras purificar los productos de PCR del gel de agarosa, estos fueron digeridos con las enzimas KpnI y XhoI (Takara) y ligados el vector pGL3 promoter (Promega), previamente linearizado con las mismas enzimas de restricción. La selección, amplificación y comprobación de clones positivos se realizó tal y como se ha descrito para la región *Ccl17 enhancer 3*. Para cada una de las construcciones definitivas, se realizó una comprobación final mediante

secuenciación usando el Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) utilizando el primer *pGL3 sequencing* que se encuentra en la tabla 5 y el secuenciador de ADN ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

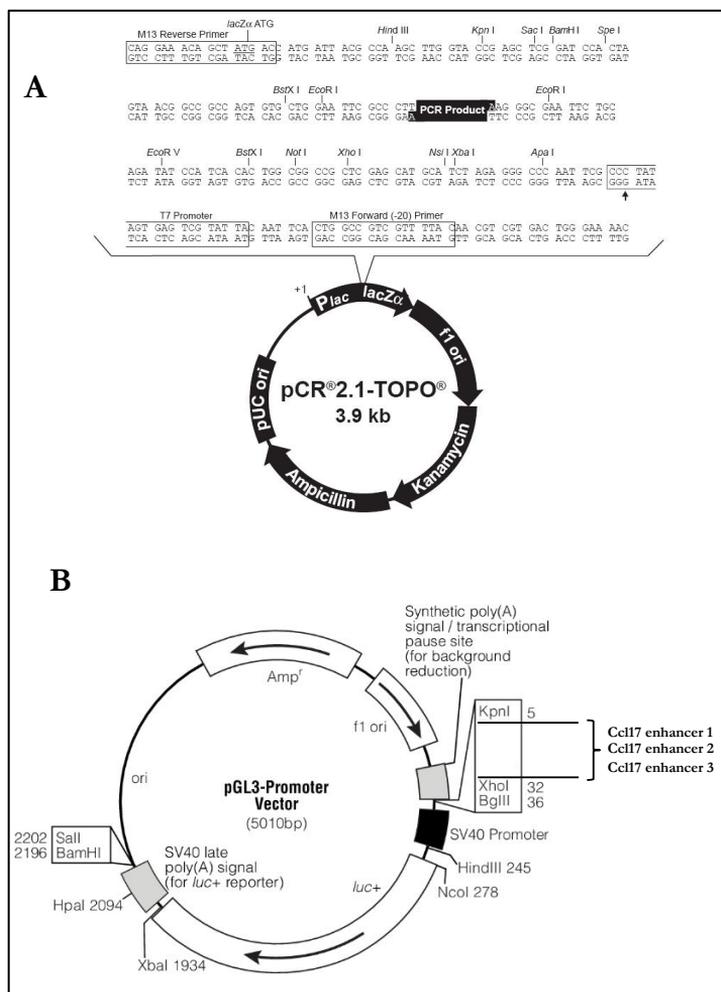


Figura 15. Generación de las construcciones Cd17 enhancer 1, 2 y 3. A) El fragmento *Ccl17 enhancer 3* fue clonado en el vector pCR2.1 B) Las construcciones *Ccl17 enhancer 1, 2 y 3* fueron clonadas en el vector pGL3 promoter en las dianas de restricción KpnI y XhoI.

12. Transfección transitoria y evaluación de actividad *enhancer* de la transcripción.

Células de la línea de macrófagos RAW264.7 fueron sembradas en placas de 12 pozos a razón de 100.000 células por pozo el día anterior a la transfección. Las células fueron a continuación transfectadas con 100 ng de construcción (*Ccl17 enhancer 1*, *Ccl17 enhancer 2* o *Ccl17 enhancer 3*) o de pGL3 vacío (como control de la actividad basal del promotor SV40 en ausencia de *enhancer*). Para evaluar si la actividad de los *enhancer* es regulada por IRF4 co-transfectamos las células con un plásmido pMIG-IRF4 que expresa constitutivamente IRF4 (So et al., 2017). Además co-transfectamos 500 ng de pcDNA3-LXR α , plásmido de expresión de LXR α , para asegurar una buena respuesta al agonista de LXR y 10 ng de plásmido de expresión de renilla como control de la eficiencia de transfección. Para realizar la transfección utilizamos Superfect (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de realizar los estímulos pertinentes, las células fueron lavadas con PBS y lisadas con un tampón de lisis (Promega).

La actividad luciferasa fue evaluada utilizando el *Dual Luciferase Reporter Assay* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante en un luminómetro Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Suiza). Los valores de actividad luciferasa fueron normalizados usando los valores de actividad renilla.

13. Modelo *in vivo* para la evaluación de los efectos de los agonistas de LXR sobre la proliferación tumoral y sobre el microambiente tumoral.

3 x 10⁶ células de la línea celular 3LLR, a una concentración de 15x10⁶/ml, fueron inyectadas de manera subcutánea en el lomo de ratones macho WT (C57BL/6) o de ratones deficientes en LXR α y β (LXR $\alpha\beta$ -/-; en entorno genético C57BL/6. Al séptimo día, una vez establecido el tumor, y durante los siguientes 8 días, los animales recibieron una dosis diaria del agonista de LXR T1317 (15 mg/kg de animal) vía intraperitoneal. Los animales control recibieron una dosis equivalente de vehículo (DMSO) diluido en PBS. Durante este mismo periodo, se tomaron medidas de anchura (lado corto) y largura (lado largo) diarias de los tumores utilizando un pie de rey. Al final del experimento, el volumen tumoral se calculó utilizando la fórmula $V = \pi \times (d^2 \times D) / 6$ donde V es el volumen, d es la anchura y D la largura (Casazza et al., 2013). El día 15 de experimento, los animales fueron sacrificados y los tumores extirpados. Para la detección de células mieloides y obtención de TAMs, los tumores fueron procesados individualmente siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5. Obtención de TAMs. Durante el procesado tumoral, antes del tratamiento con enzimas digestivas, se apartaron 500 μ l de sobrenadante para la cuantificación de quimiocinas. Los TAMs obtenidos tras la separación celular fueron directamente lisados y procesados para la obtención de ARN. El análisis de la expresión génica en estas células se llevó a cabo siguiendo los métodos descritos en el apartado 6. Extracción de ARN generación de ADNc y PCR cuantitativa a tiempo real.

Resultados

Estudio 1. Caracterización de los efectos de LXR sobre la proliferación y expresión de genes asociados a metástasis en células de cáncer de mama humanas

Para la realización de este estudio se escogieron como modelo las líneas celulares de cáncer de mama humanas LM2-4175 y BM-1833. Éstas líneas celulares se originaron a partir de la línea celular MDA-MB-231 y tienen la particularidad de presentar una mayor capacidad para formar metástasis a pulmón (LM2-4175) y hueso (BM-1833)(Minn et al., 2005; Kang et al., 2003). Además de estas líneas celulares, para este estudio hemos generado las líneas celulares LM2-4175-LXR α y BM-1833-LXR α , que fueron transfectadas establemente con un plásmido que expresa LXR α (ver materiales y métodos). También intentamos, sin éxito, generar líneas transfectadas con plásmido de expresión de LXR β . Es posible que la sobreexpresión de LXR β no sea compatible con la proliferación de estas líneas celulares.

1.1 Estudio del papel de LXR sobre la proliferación tumoral en células de cáncer de mama humanas.

Para empezar, realizamos análisis de proliferación *in vitro*. Primero analizamos si, en ausencia de agonistas sintéticos, había diferencias entre las líneas celulares que expresan establemente LXR α y las que no. Incubamos las células en medio DMEM suplementado con FCS al 1% y las dejamos proliferar. Al cabo de 1, 3 y 7 días determinamos el número de células mediante un hematocitómetro, descartando las células muertas con azul de tripano. Los resultados de este ensayo (figura 16) demostraron que en las células de metástasis a pulmón no había diferencias entre la línea que expresa

establemente LXR α y la que no (figura 16A), mientras que si se observaron diferencias entre las células BM-1833 y BM-1833- LXR α (figura 16B).

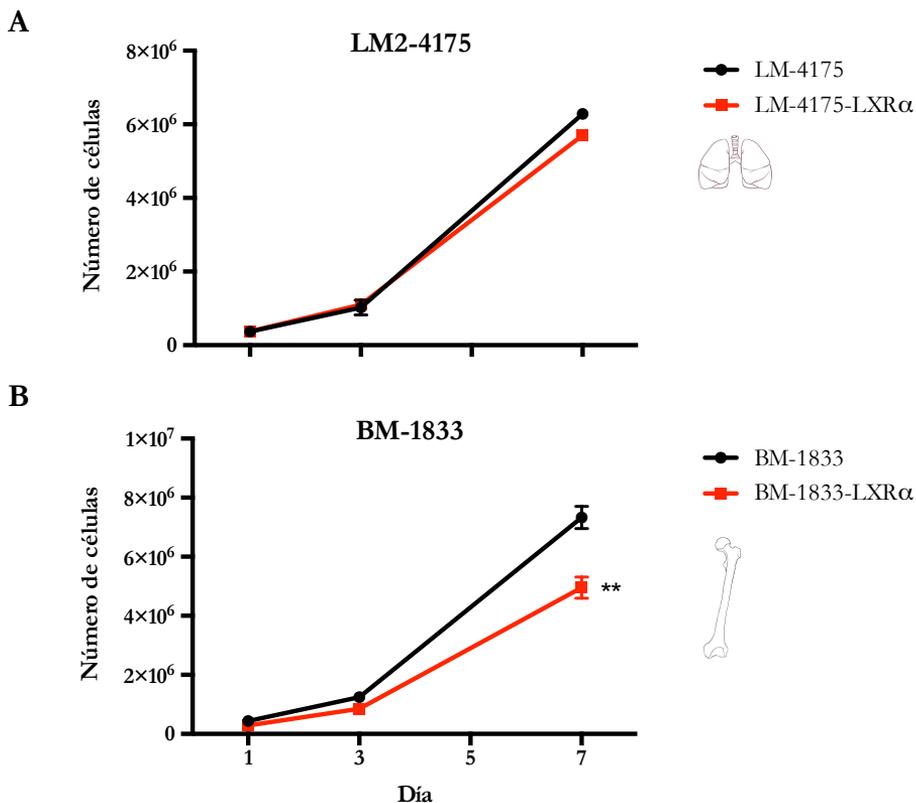


Figura 16. Efectos de la expresión estable de LXR α sobre la proliferación de las células LM2-4175 y BM-1833. Las células con tropismo a pulmón (A) o hueso (B) fueron sembradas en medio DMEM con un 1% de FCS y se dejaron proliferar. Al cabo de 1, 3 y 7 días fueron recuperadas y contadas usando un hematocitómetro, descartando las células no viables con azul de tripano. En cada experimento, cada condición experimental fue llevada a cabo por duplicado. El número de células en cada duplicado corresponde al promedio de cuatro contajes. En el gráfico se muestra el promedio de tres experimentos +/- SEM para las células de pulmón (A) y seis experimentos para las células de hueso (B). Para el análisis estadístico se realizó una prueba T-Student comparando los valores a día 7. ** p-valor<0,01

Seguidamente estudiamos si el tratamiento con el agonista de LXR T1317 tiene efectos anti-proliferativos. Para ello estimulamos las células con vehículo (DMSO) o T1317 en dosis crecientes (1, 5 y 10 μM) y determinamos el número de células al cabo de 1, 3 y 7 días.

En las figuras 17 y 18 se muestran los efectos del tratamiento con T1317 en la proliferación de las células metastáticas. De entrada, en las cuatro líneas analizadas (LM2-4175, LM2-4175-LXR α , BM-1833 y BM-1833-LXR α) observamos una reducción de la proliferación que se produce de manera dosis-dependiente. Además vemos que la sensibilidad al tratamiento con T1317 aumenta si las células expresan establemente LXR α . En las células que no lo hacen, el tratamiento con T1317 a 1 μM no tiene ningún efecto, a diferencia de las células que sí expresan LXR α establemente. Además, en estas últimas los efectos del tratamiento a 10 μM son más potentes.

Posteriormente, evaluamos si los efectos anti-proliferativos observados estaban causados por una alteración en el ciclo celular. Para ello, estimulamos las células LM-4175, LM-4175-LXR α , BM-1833 y BM-1833-LXR α con vehículo (DMSO) o con concentraciones crecientes del agonista T1317 (1, 5 y 10 μM) durante 24 horas y analizamos el ciclo celular mediante marcaje con yoduro de propidio y citometría de flujo (figura 19). Con esta tinción podemos determinar el porcentaje de núcleos que contienen una cantidad de ADN equivalente a $2n$ (células en fase G1), el porcentaje de núcleos que tienen una cantidad de ADN equivalente a $4n$ (fase G2) y, finalmente, aquellos núcleos que contienen una cantidad de ADN entre $2n$ y $4n$, es decir, aquellos que se encuentran en estado de replicación del genoma (fase S) (figura 14).

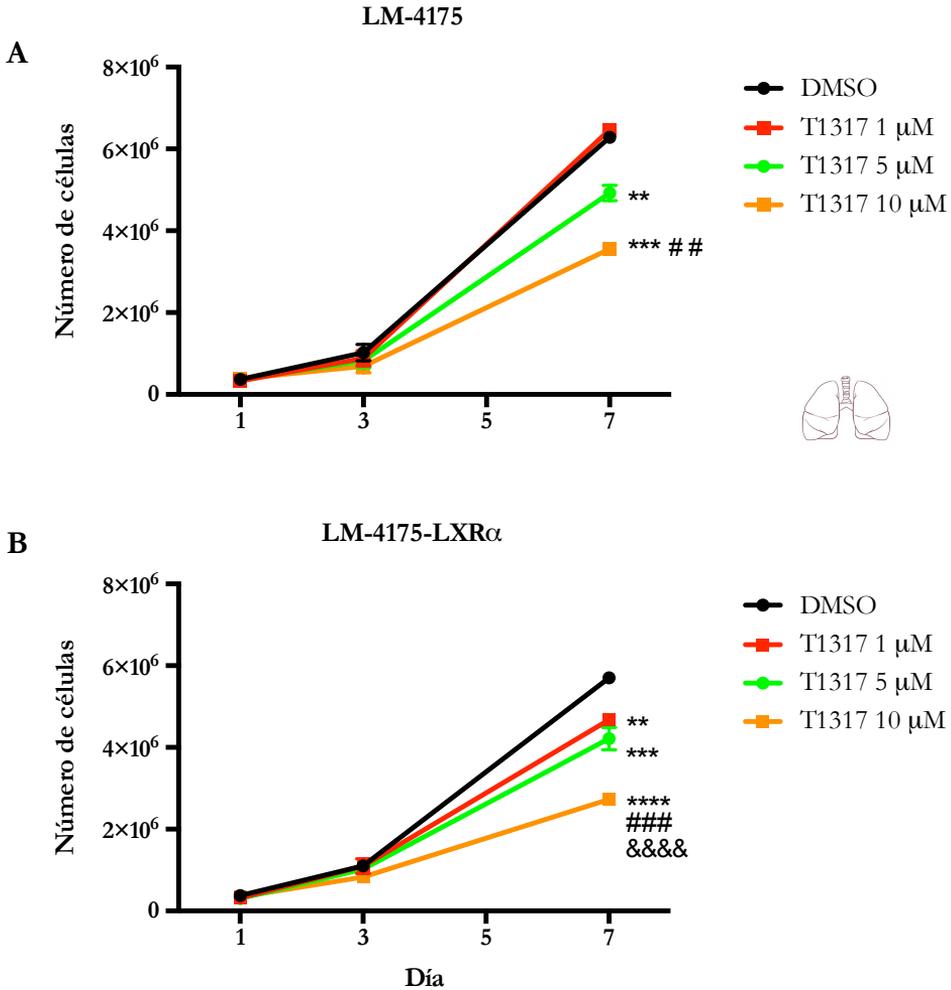


Figura 17. El tratamiento con T1317 reduce la proliferación de las células LM-4175 de manera dosis-dependiente. Las células LM2-4175 (A) y LM2-4175-LXR α (B) fueron sembradas en DMEM suplementado con 1% de suero y estimuladas con dosis crecientes de T1317 (1, 5 10 μ M) o vehículo (DMSO). Al cabo de 1, 3 y 7 días se determinó el número de células con un hematocítmetro descartando las células muertas con azul de tripano. Se muestra el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. Análisis estadístico, test de Anova a día 7 más un test de comparaciones múltiples de Bonferroni. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs DMSO. ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs T1317 1 μ M. &&& $p < 0,0001$ vs T1317 5 μ M.

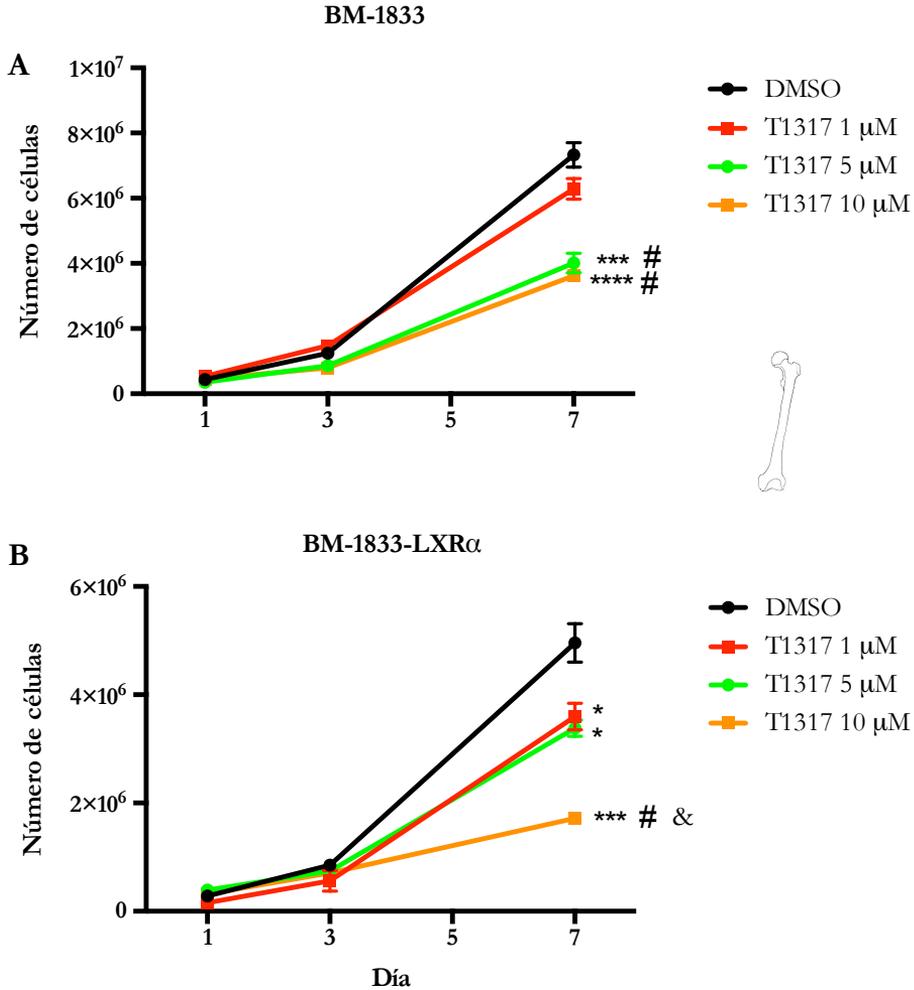


Figura 18. El tratamiento con T1317 reduce la proliferación de las células BM-1833 de manera dosis-dependiente. Las células BM-1833 (A) y BM-1833-LXR α (B) fueron sembradas en DMEM suplementado con 1% de suero y estimuladas con dosis crecientes de T1317 (1, 5 10 μ M) o vehículo (DMSO). Al cabo de 1, 3 y 7 días se determinó el número de células con un hematocitómetro descartando las células muertas con azul de tripano. Se muestra el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. Análisis estadístico, test de Anova a día 7 más un test de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs DMSO. # $p < 0,05$, vs T1317 1 μ M. & $p < 0,05$ vs T1317 5 μ M.

En la figura 19 podemos ver el resultado del análisis del ciclo celular en las células LM2-4175, LM2-4175-LXR α , BM-1833 y BM-1833-LXR α tratadas con T1317. El tratamiento con agonista provoca una disminución del porcentaje de células en la fase S del ciclo celular y una acumulación en la fase G1, lo que se interpreta como una frenada del ciclo celular. Estos efectos se producen de manera dosis-dependiente y adquieren una significancia estadística a la dosis más alta (10 μ M). Es importante mencionar que en estos experimentos no se observó ningún incremento del porcentaje de células en la fase sub-G1, por lo tanto descartamos que hubiera un incremento de la muerte celular causada por el tratamiento con T1317.

Una vez determinados los efectos anti-proliferativos del agonista de LXR T1317 sobre las líneas celulares LM2-4175, LM2-4175-LXR α , BM-1833 y BM-1833-LXR α , analizamos posibles mecanismos mediante los cuales este tratamiento podría ejercer los efectos observados. Recientemente ha sido descrito que los LXR, mediante la inducción de la expresión de SREBP1c, inducen la transcripción del factor de transcripción MAFB en osteoclastos, una molécula importante en el control de procesos de diferenciación/proliferación (Menéndez-Gutiérrez et al., 2015). Por este motivo analizamos si esta diana está inducida por el tratamiento con T1317 en las líneas celulares de nuestro estudio. Curiosamente, el tratamiento con T1317 no induce la expresión de MAFB (figura 20), por que lo descartamos esta vía como mecanismo anti-proliferativo en nuestro sistema.

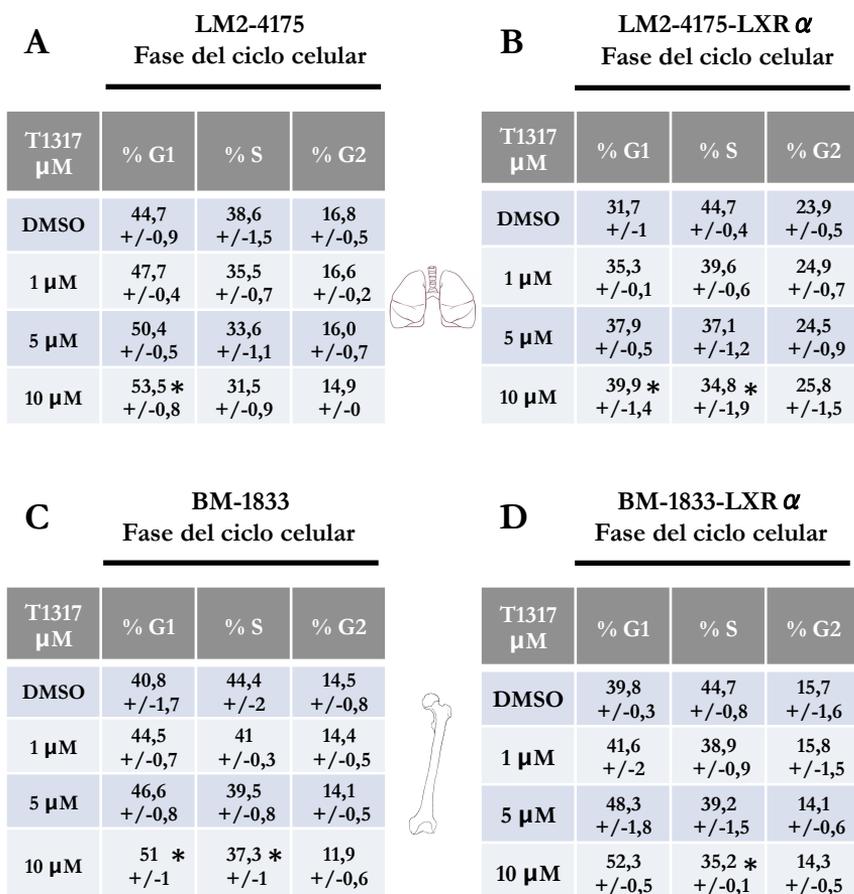


Figura 19. La activación de LXR frena la progresión a través del ciclo celular. Las células LM2-4175 (A) LM2-4175-LXR α (B) BM-1833 (C) y BM-1833-LXR α (D) se incubaron en DMEM suplementado con un 1% de FCS y se estimularon con vehículo (DMSO) o con concentraciones crecientes (1, 5 y 10 μ M) del agonista de LXR T1317 durante 24 horas. Posteriormente se fijaron e incubaron con yoduro de propidio y se analizó el contenido de ADN por citometría de flujo. En las tablas se muestran el promedio del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G1, S y G2) de tres experimentos independientes +/- SEM. Para el análisis estadístico se realizó un test de Kruskal-Wallis más un test de comparaciones múltiples de Dunn. * p-valor<0,05 vs DMSO.

Expresión de MAFB

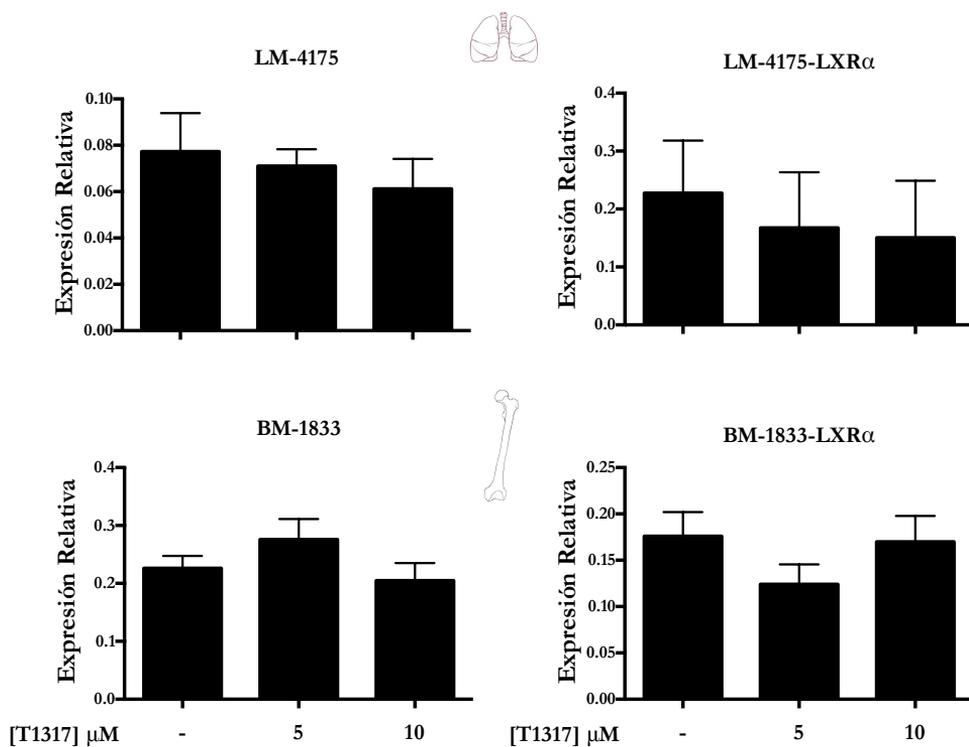


Figura 20. El tratamiento con T1317 induce la expresión del gen MAFB. Las células fueron sembradas en DMEM suplementado con un 1% de suero y estimuladas con vehículo (DMSO) o T1317 (5 y 10 μ M) durante 24h. La expresión de MAFB fue evaluada mediante extracción de ARN total y PCR cuantitativa. El grafico muestra el promedio de 3-6 experimentos +/- SEM. Para el análisis estadístico se realizó un test de Anova más un test de Bonferroni de comparaciones múltiples. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas si $p < 0,05$ vs control.

A continuación, con el objetivo de identificar posibles vías mediante las cuales LXR ejerce las funciones anti-proliferativas observadas, se realizó un estudio masivo de la expresión génica mediante la utilización de un microarray de expresión. A raíz de los resultados observados sobre la proliferación in vitro, se analizaron los efectos del agonista T1317 sobre la línea LM-4175-LXR α . Las células fueron incubadas en presencia de vehículo (DMSO) o T1317 (1 μ M) durante 24 horas. Dos muestras biológicas independientes fueron analizadas para cada condición experimental. La estimación de la expresión de los diferentes genes se calculó a partir del algoritmo WWP (Auer et al., 2007). Estas estimaciones generadas por WWP representan valores de log₂. A partir de estos valores se calculó el cambio de la expresión de cada gen (*fold change*) entre las células tratadas y las células control. Se consideraron genes afectados por el tratamiento con agonista, tanto aquellos genes cuya expresión estaba inducida dos veces o más, como aquellos genes cuya expresión estaba reprimida un 30% o más. Siguiendo este criterio se observó que el tratamiento con T1317 afecta la expresión de 1296 genes, de los cuales 104 están inducidos y 1192 reprimidos. En la figura 21 se muestra un mapa cromático generado mediante el programa CIMMiner a partir de los valores de expresión (log₂) de todos los genes afectados por el tratamiento con T1317.

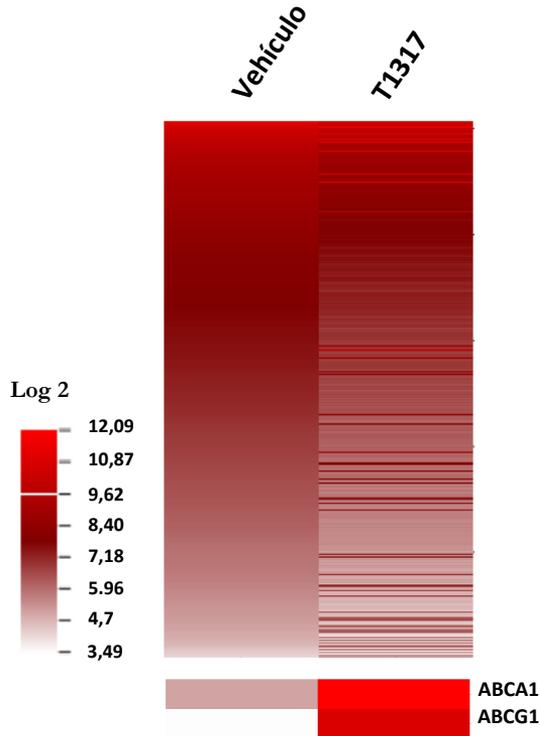


Figura 21. Efectos del agonista de LXR sobre la expresión génica de las células LM-4175-LXR α . Los efectos de la activación de LXR sobre la expresión génica fueron evaluados mediante array de expresión génica. Las células fueron estimuladas con el agonista T1317 (1 μ M) o con vehículo (DMSO) en medio DMEM suplementado con 1% de FCS durante 24h. Se calculó el promedio de la expresión de dos muestras biológicas independientes para cada condición experimental. A continuación, para cada gen se determinó el cambio de expresión génica (*fold change*) entre las células tratadas con T1317 y las células control. Seleccionamos aquellos genes con una inducción por T1317 de dos veces o más o una represión por T1317 del 30% o más. El mapa cromático muestra la expresión en log2 de todos los genes seleccionados. El mapa cromático se generó utilizando el programa CIMMiner. La expresión de ABCA1 y ABCG1 se muestra como control de la activación de LXR.

A continuación, analizamos en qué procesos biológicos, determinados por el consorcio de Gene Ontology (Ashburner et al., 2000), participan los genes afectados por el tratamiento con T1317. Realizamos este análisis con el programa DAVID 6.7 Functional Annotation Tool (National Institute of allergy and infectious Diseases, NIAID) (Huang et al., 2009). Con este programa pudimos analizar qué funciones biológicas están estadísticamente enriquecidas (p -valor $<0,05$) en la lista de genes afectados por el tratamiento con agonista de LXR. Como podemos ver en la tabla 6, hay un enriquecimiento de diversas funciones biológicas asociadas a la regulación de la proliferación y del ciclo celular. Además, hay una gran cantidad de genes afectados por el tratamiento con agonista de LXR que participan en estas funciones biológicas asociadas a proliferación. Esto nos indicaría que el tratamiento con T1317 posiblemente esté afectando la proliferación de estas células de manera compleja y por múltiples vías. Nos llamó la atención en concreto la presencia del término *G1/S transition of mitotic cell cycle* ya que, precisamente habíamos observado una bloqueo del ciclo celular en este punto. De entre los genes asociados al término *G1/S transition of mitotic cell cycle* (tabla 6), la ubiquitina ligasa SKP2 forma parte del conjunto de genes reprimidos por T1317. Dado que SKP2 regula positivamente la degradación del inhibidor del ciclo celular p27, decidimos confirmar los efectos del tratamiento con T1317 sobre la expresión de este gen.

Tabla 6. Funciones biológicas enriquecidas entre los genes afectados por el tratamiento con T1317 en las células LM2-4175-LXR α . A partir de los datos de expresión génica obtenidos en el microarray, obtuvimos una lista de genes que se ven afectados (inducidos o reprimidos) por el tratamiento con T1317. Esta lista fue analizada con el programa DAVID 6.7 Functional Annotation Tool para obtener una lista de los procesos biológicos sobre-representados en la lista de genes afectados por T1317. En la parte inferior de la tabla se indican los genes asociados con el término de Gene Ontology *G1/S transition of mitotic cell cycle*. Todos los genes asociados a este término estuvieron reprimidos en el microarray.

Término de Gene Ontology	Número de genes	p-valor
cell cycle	77	1,30E-07
response to DNA damage stimulus	46	2,10E-07
DNA metabolic process	56	3,20E-07
DNA repair	36	2,90E-06
regulation of transcription	186	6,80E-06
DNA recombination	19	9,50E-06
cellular response to stress	54	4,00E-05
regulation of organelle organization	27	8,80E-05
M phase	35	1,60E-04
negative regulation of cell differentiation	25	5,00E-04
mitotic cell cycle	36	6,70E-04
chromosome organization	44	6,80E-04
cell cycle arrest	15	1,10E-03
regulation of RNA metabolic process	124	2,20E-03
regulation of cytoskeleton organization	17	2,30E-03
G1/S transition of mitotic cell cycle*	10	2,60E-03
regulation of centrosome duplication	4	2,60E-03
activation of protein kinase activity	15	2,90E-03
virus-host interaction	6	3,30E-03
M phase of meiotic cell cycle	13	5,70E-03
meiosis	13	5,70E-03
mRNA transport	12	6,20E-03
regulation of cell migration	18	8,60E-03
regulation of transferase activity	32	8,70E-03
nucleocytoplasmic transport	17	8,80E-03

*Genes asociados al término *G1/S transition of mitotic cell cycle*:

DBF4, SKP2, CAMK2G, CUL5, CDKN3, EGFR, INHBA, ITGB1
NPAT, PPP3CA

En la figura 22 vemos los efectos del tratamiento con T1317 sobre la expresión de SKP2 en las células LM2-4175, LM2-4175-LXR α , BM-1833 y BM-1833-LXR α . Este tratamiento reprime la expresión de SKP2, confirmando los resultados obtenidos en el array de expresión en las células LM2-4175-LXR α .

Expresión de SKP2

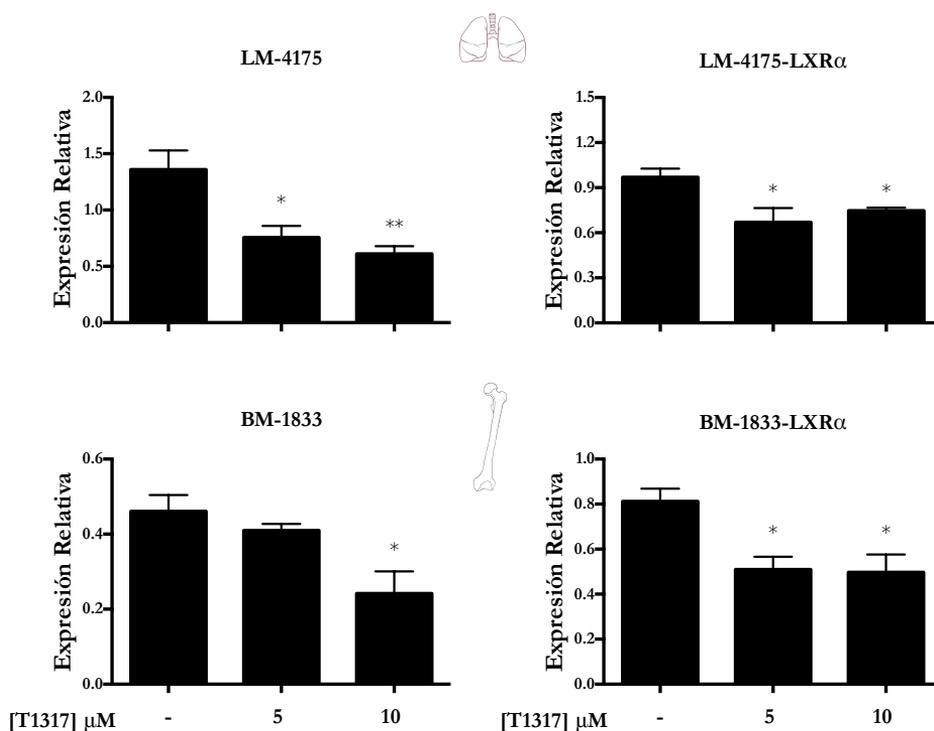


Figura 22. El tratamiento con T1317 reprime la expresión del gen SKP2. Las células fueron sembradas en DMEM suplementado con un 1% de suero y estimuladas con vehículo (DMSO) o T1317 (5 y 10 μ M) durante 24h. La expresión de SKP2 fue evaluada mediante extracción de ARN total y PCR cuantitativa. El gráfico muestra el promedio de 3-6 experimentos +/- SEM. Para el análisis estadístico se realizó un test de Anova más un test de Bonferroni de comparaciones múltiples. *p<0,05 vs control.

Seguidamente analizamos si la represión de la expresión de SKP2 se traducía en un aumento de los niveles de p27. Sorprendentemente, al tratar las células con T1317 los niveles de proteína de p27 no aumentaron (figura 23).

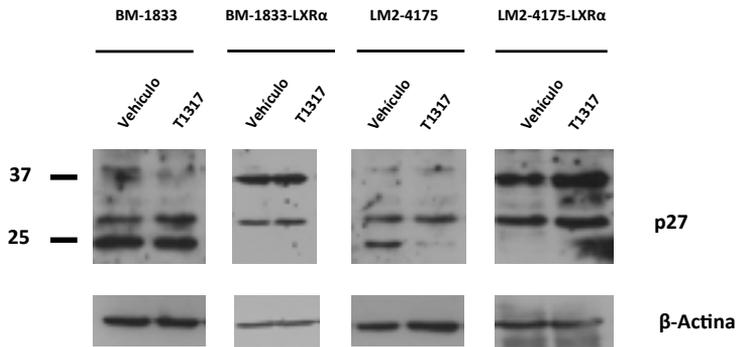


Figura 23. El tratamiento con T1317 no incrementa los niveles de p27 en las células BM-1833, BM-1833-LXR α , LM2-4175 y LM2-4175- LXR α . Las células fueron incubadas en DMEM suplementado con un 1% de FCS y estimuladas con T1317 5 μ M durante 24 horas. Se extrajo proteína total y la expresión de p27 fue analizada por western blot usando un anticuerpo específico contra p27. Se muestra una imagen representativa. Se realizaron 4 experimentos independientes.

Dado que los niveles de p27 no fueron alterados con el tratamiento con T1317 decidimos tratar de identificar otras dianas que pudieran explicar los efectos anti-proliferativos observados. Con este objetivo analizamos los datos del array de expresión realizado en las células LM2-4175-LXR α y centramos nuestra atención en aquellos genes que experimentan una represión mayor por el agonista de LXR y que, según la literatura, pudieran tener una implicación relevante en la capacidad tumoral de estas células. Uno de los

genes que más nos llamo la atención fue TMEPAI/PMEPA1. PMEPA1 (reprimido un 50% aproximadamente en el microarray) es un gen inducido directamente por el factor TGF β (Brunschwig et al., 2003) que participa en un bucle de control negativo de la intensidad y la duración de la señalización por TGF β (Bai et al., 2014). PMEPA1 también es inducido por otros factores, por ejemplo, el andrógeno o el factor EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Vo Nguyen et al., 2014). PMEPA1 está constitutivamente sobre-expresado en una gran variedad de cánceres (colon, mama, pulmón y riñón entre otros) y suele asociarse con un mal pronóstico de la enfermedad (Brunschwig et al., 2003; Giannini et al., 2003).

Curiosamente, estudios realizados en la línea celular MDA-MB-231, de la cual se derivan las líneas celulares metastáticas utilizadas en este trabajo, demuestran que PMEPA1 convierte a TGF β de un factor supresor de tumor a un factor promotor de tumor en cáncer de mama (Singha, et al., 2010). Dada la relevancia de esta molécula, analizamos la expresión de PMEPA1 tanto en las células LM2-4175-LXR α como en las BM-1833-LXR α después de haber sido tratadas con el agonistas T1317. Como vemos en la figura 24, el tratamiento con T1317 claramente reprime la expresión de PMEPA1 en las células LM2-4175-LXR α y BM-1833-LXR α .

Expresión de PMEPA1

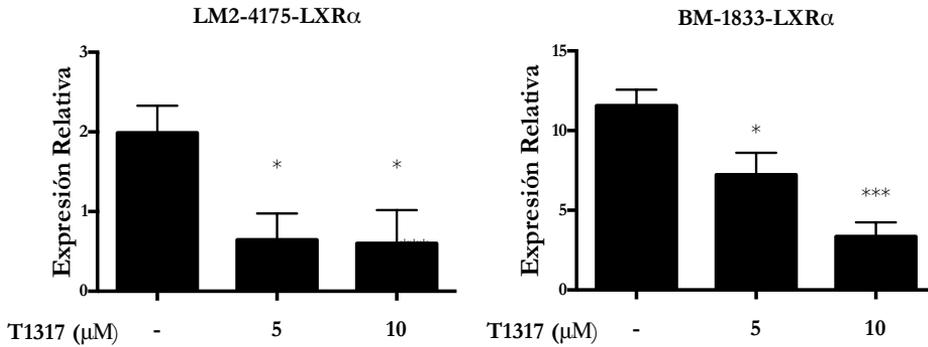


Figura 24. El tratamiento con T1317 reprime la expresión del gen PMEPA1. Las células fueron sembradas en DMEM suplementado con un 1% de suero y estimuladas con vehículo (DMSO) o T1317 (5 y 10 μ M) durante 24h. La expresión de PMEPA1 fue evaluada mediante extracción de ARN total y PCR cuantitativa. El grafico muestra el promedio de cuatro experimentos +/- SEM. Para el análisis estadístico se realizó un test de Anova más un test de Bonferroni de comparaciones múltiples. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

En un trabajo realizado en líneas de cáncer de próstata negativas para el receptor de andrógeno, se describe una vía mediante la cual PMEPA1, a través de la represión del inhibidor del ciclo celular p21, induce la proliferación celular (R. Liu et al., 2011). Por este motivo analizamos la transcripción de p21 en las células LM2-4175-LXR α y BM-1833-LXR α en las que habíamos observado la represión de PMEPA1 (figura 25).

Expresión de p21

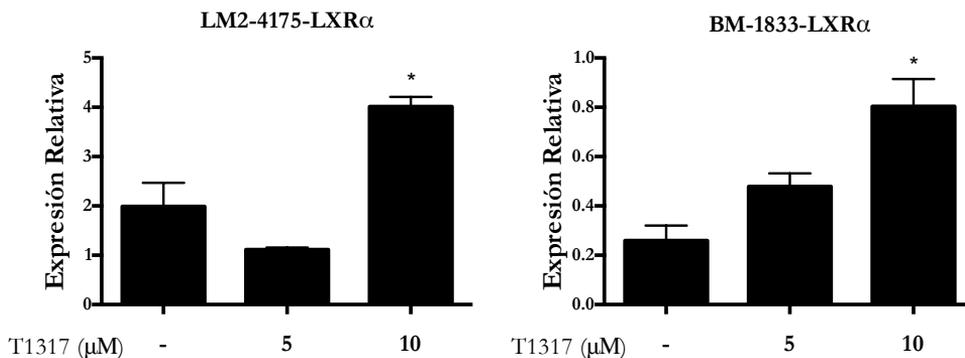


Figura 25. El tratamiento con T1317 induce del gen p21. Las células fueron sembradas en DMEM suplementado con un 1% de suero y estimuladas con vehículo (DMSO) o T1317 (5 y 10 μM) durante 24h. La expresión de p21 fue evaluada mediante extracción de ARN total y PCR cuantitativa. El gráfico muestra el promedio de 4 experimentos \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó un test de Anova más un test de Bonferroni de comparaciones múltiples. $*p < 0,05$.

En la figura 25 podemos ver como el tratamiento con T1317 aumenta la expresión de p21 a nivel de mRNA. De forma conjunta, estos datos sugieren que la represión de PMEPA1 y el aumento transcripcional de p21 podrían representar un nuevo mecanismo a través del cual LXR ejerce sus efectos anti-proliferativos.

1.2 Estudio del papel de LXR sobre el perfil de expresión génica asociado a metástasis de células de cáncer de mama hacia pulmón o hueso.

Como se ha mencionado anteriormente, las líneas celulares de cáncer de mama humanas LM2-4175 y BM-1833 poseen una especial virulencia metastática específica hacia pulmón y hueso, respectivamente, y esa virulencia ha sido asociada a un perfil de expresión génica definido (tablas 1 y 2) (Minn et al., 2005; Kang et al., 2003).

Para evaluar los efectos de los agonistas de LXR sobre el perfil de expresión génica asociada a metástasis, analizamos los datos del microarray realizado con las células LM2-4175-LXR α , esta vez centrándonos solamente en aquellos genes presentes en el perfil de expresión génica asociado a metástasis a pulmón (tabla 1). Fijamos nuestra atención en dos tipos de efectos: a) efectos negativos (mínimo un 15% de represión) del agonista de LXR sobre la expresión de genes cuya inducción se asocia al perfil metastático a pulmón (Minn et al., 2005); b) efectos positivos (aumento de dos veces o más) del agonista de LXR sobre genes cuya represión está asociada a la adquisición del perfil metastático de las células de cáncer de mama a pulmón (Minn et al., 2005).

Teniendo en cuenta las restricciones en el nivel de cambio mencionadas arriba, ninguno de los genes cuya represión está asociada a metástasis a pulmón experimentó una de-represión sustancial en las células LM2-4175-LXR α estimuladas con agonista. Por el contrario, la activación de LXR resultó en la represión moderada de seis genes cuya inducción ha sido asociada al perfil pro-metastático (figura 26), lo que representa un 11% del conjunto de genes del perfil metastático.

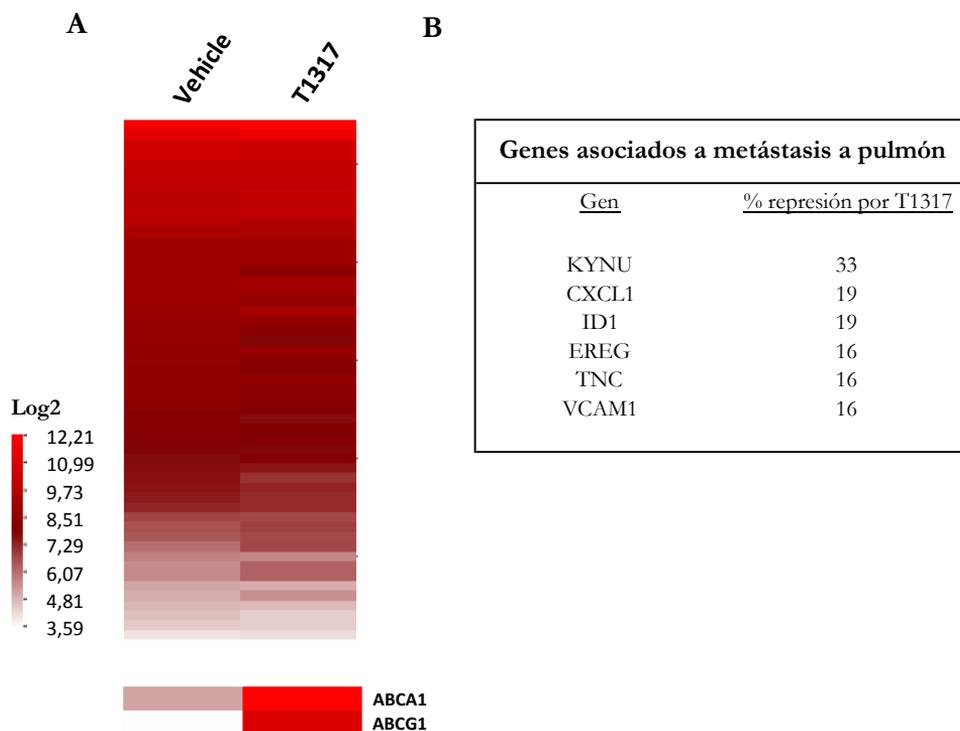


Figura 26. La activación de los LXR modifica levemente el perfil de expresión génica asociado a metástasis a pulmón. A) Los efectos de la activación de LXR sobre el perfil de expresión de metástasis a pulmón fue evaluado mediante array de expresión génica. Las células fueron estimuladas con el agonista T1317 (1 μ M) o con vehículo (DMSO) en medio DMEM suplementado con 1% de FCS durante 24h. Para cada condición se calculó el promedio de los niveles de expresión de dos experimentos independientes. Con estos valores se realizó el mapa cromático. B) Para calcular el porcentaje de represión por T1317, para cada gen se sustrajo el valor de la expresión (en log 2) en las células tratadas con vehículo al valor de la expresión en las células tratadas con T1317. Así se obtuvo un valor de cambio de la expresión génica (*fold change*) en log2 al que posteriormente se le aplicó el anti-logaritmo. Se consideró represión, reducciones de la expresión mayores del 15%.

Para confirmar los resultados observados en el microarray, se seleccionaron los genes reprimidos, y su expresión fue analizada mediante qPCR en células que fueron estimuladas durante 24 horas con concentraciones crecientes de T1317 (1, 5 y 10 μM) (figura 27). De los genes de los cuales habíamos observado represión en el microarray, solamente EREG, CXCL1 y VCAM1 mostraron represión estadísticamente significativa en el análisis por qPCR. Además, se extendió el análisis a otros genes que no habían superado el filtro de selección en el estudio con microarrays de expresión. SPANX1B y CASP1 resultaron estar moderadamente reprimidos en estos análisis.

En paralelo, se estudió también el efecto de los agonistas de LXR sobre el perfil de expresión génica asociado a metástasis de hueso de las células BM-1833-LXR α (tabla 2). En este caso, seleccionamos y analizamos la expresión de genes de este perfil, con especial atención en aquellos genes con relevancia biológica en la inducción de metástasis a hueso por su papel determinante en el direccionamiento (CXCR4), la invasión (MMP1), la angiogénesis (FGF5, CTGF) y la osteolisis (IL-11), cuya expresión está aumentada en la línea celular BM-1833-LXR α en comparación con la línea celular parental MDA-MB-231 (Kang et al., 2003). Para ello incubamos las células BM-1833-LXR α en medio DMEM suplementado con un 1% de FCS en presencia de vehículo (DMSO) o del agonista de LXR T1317 en concentraciones crecientes (1, 5 y 10 μM) durante 24 horas (figura 28). De los genes analizados, solamente observamos represión significativa (de alrededor del 50%) sobre el gen CTGF.

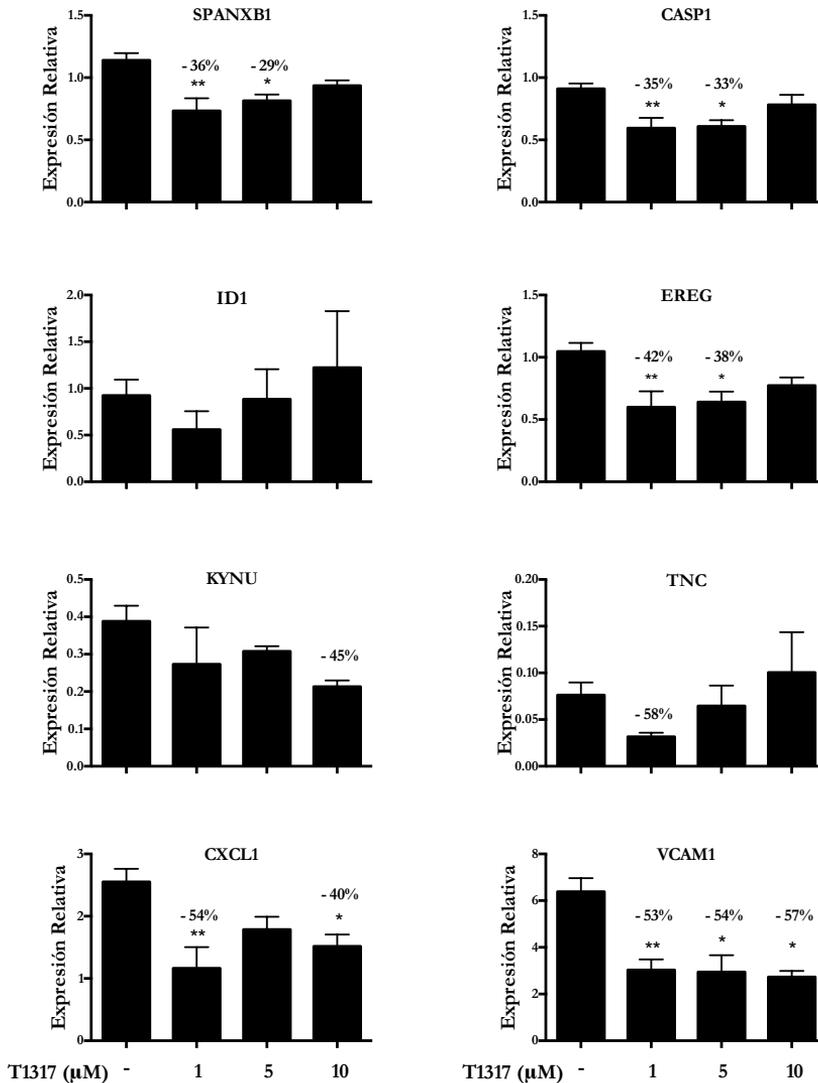


Figura 27. LXR regula negativamente la expresión de un subconjunto de genes asociados a metástasis a pulmón en las células LM2-4175-LXR α . Las células fueron estimuladas con T1317 a concentraciones crecientes (1, 5 o 10 μ M) o con vehículo (DMSO) durante 24h en DMEM con un 1% de FCS. La expresión fue evaluada mediante extracción de ARN total y PCR cuantitativa. Los niveles de expresión de cada gen fueron normalizados usando los niveles de expresión de ciclofilina. Los gráficos muestran el promedio de 3-4 experimentos \pm SEM mediados por T1317. Se indican los porcentajes de represión. En el análisis estadístico se realizó Anova de un factor más el test de Bonferroni de comparaciones múltiples. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$.

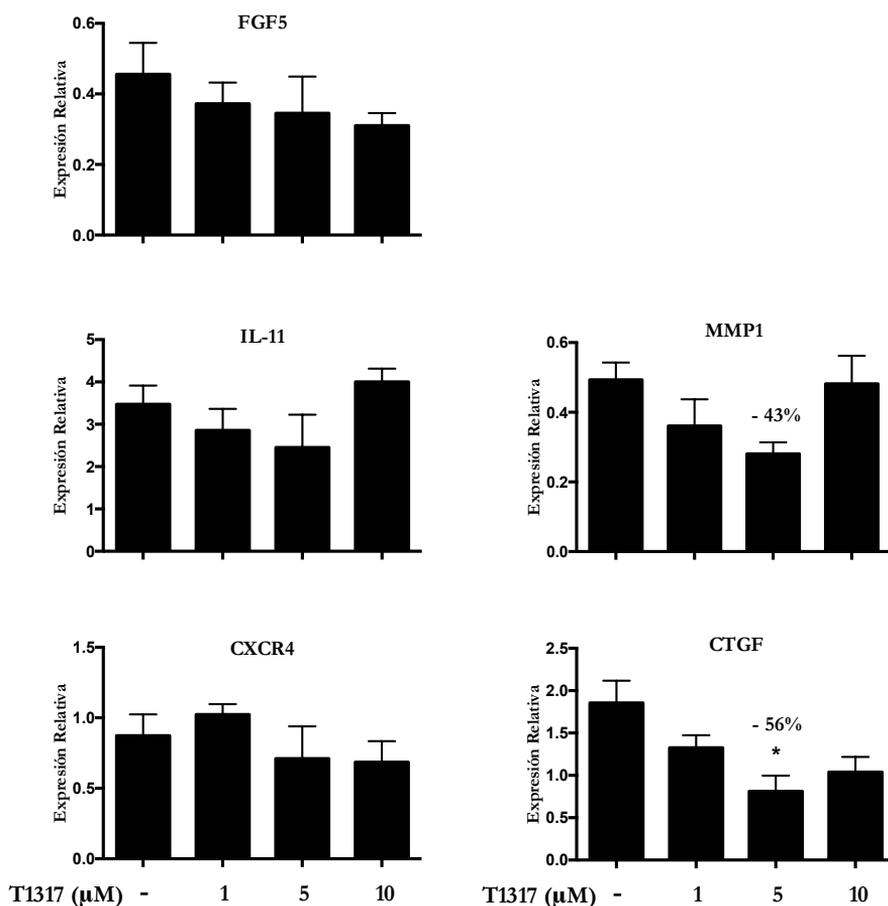


Figura 28. El tratamiento con agonista de LXR ejerce efectos represores discretos sobre la expresión de genes relevantes biológicamente en la inducción de metástasis a hueso. Las células BM-1833-LXR α fueron estimuladas con T1317 a concentraciones crecientes (1, 5 o 10 μ M) o con vehículo (DMSO) durante 24h en DMEM con un 1% de FCS. La expresión fue evaluada mediante extracción de ARN total y PCR cuantitativa. Los gráficos muestran el promedio de 4 experimentos \pm SEM. En el análisis estadístico se realizó Anova de un factor más el test de Bonferroni de comparaciones múltiples. * $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos en el análisis de expresión génica realizado en las células LM-4175-LXR α (pulmón) y BM-1833-LXR α (hueso) nos indican que los LXR ejercen efectos represores moderados sobre un subconjunto de genes del perfil asociado a metástasis a pulmón.

Estudio 2. Papel de LXR sobre la expresión de quimiocinas en macrófagos asociados a tumor.

En este estudio hemos analizado el efecto de la activación de LXR sobre un modelo de crecimiento tumoral en ratones inmunocompetentes. Para realizar estos estudios escogimos la línea tumoral 3LLR (*Lewis lung carcinoma*) (Mayo JG, 1972), que inyectada de manera subcutánea forma tumores sólidos fácilmente medibles.

Al igual que en las líneas tumorales estudiadas en el capítulo anterior, el tratamiento con los agonistas de LXR ejerce efectos anti-proliferativos *in vitro* sobre la línea celular 3LLR. En estos experimentos, estimulamos las células con vehículo (DMSO) o con concentraciones crecientes (1, 5 y 10 μM) de los agonistas de LXR T1317 o GW3965 durante 24 horas y, posteriormente, evaluamos la capacidad proliferativa de las células midiendo la incorporación de timidina tritiada durante la síntesis del ADN. En la figura 29A observamos que tanto el tratamiento con T1317 como el tratamiento con GW3965 inhiben la proliferación *in vitro* de las células 3LLR de manera dosis-dependiente.

Posteriormente, realizamos los estudios de desarrollo tumoral *in vivo*. Para ello, inoculamos las células 3LLR de manera subcutánea en ratones WT o $\text{LXR}\alpha\beta^{-/-}$ y dejamos establecer el tumor durante 7 días. A partir del séptimo día y hasta el quinceavo día, se inyectó una dosis diaria de T1317 vía intraperitoneal y se analizó la progresión del tumor.

Como se puede apreciar en la figura 30, el tratamiento con T1317 redujo significativamente el crecimiento tumoral en los ratones WT pero no en los ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$. Cabe destacar que a pesar de que el ratón es deficiente en LXR, las células 3LLR inoculadas expresan LXR (figura 29B). Por lo tanto, estos datos sugieren que al margen del efecto anti-proliferativo que los LXR ejercen sobre la propia célula tumoral, y que hemos demostrado en los ensayos *in vitro* (figura 29A), la activación de LXR afecta el crecimiento tumoral *in vivo* a través de mecanismos que requieren la expresión de LXR en otras células del microambiente tumoral. Por este motivo decidimos estudiar el papel de en células del microambiente tumoral que afectan el desarrollo del tumor.

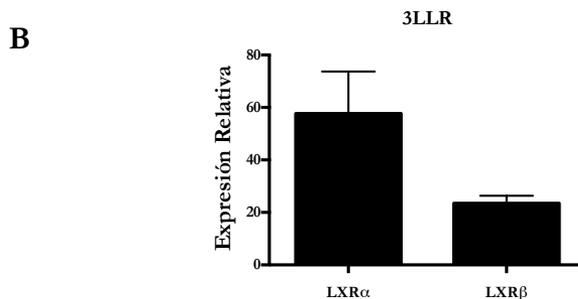
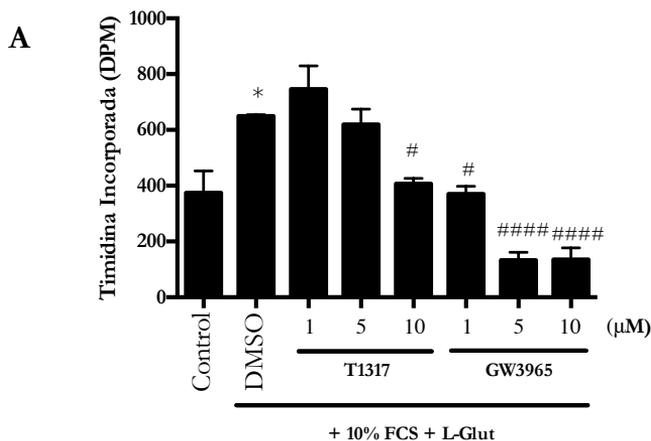
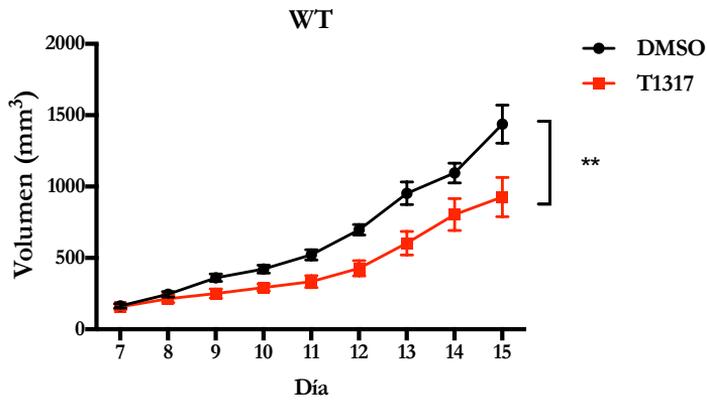


Figura 29. Los agonistas de LXR inhiben la proliferación de las células 3LLR de manera dosis-dependiente. A) Las células 3LLR fueron incubadas en medio RPMI en presencia de los agonistas de LXR T1317 o GW3965 o de vehículo (DMSO) y privadas de nutrientes añadidos (Control) durante 24 horas. Posteriormente suplementamos el medio con un 10% de suero y L-glutamina (0,3 g/l) para inducir la proliferación de las células durante otras 24 horas. A continuación se añadió timidina- H^3 durante 6 horas y finalmente se midió la síntesis de ADN mediante la cuantificación de la incorporación de la timidina- H^3 . El gráfico muestra el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. Como análisis estadístico se realizó un test de Anova más el test de comparaciones múltiples de Tukey. * $p < 0,05$ comparado con Control. # $p < 0,05$, #### $p < 0,0001$ comparado con DMSO. B) La expresión de LXR α y β fue comprobada mediante qPCR. Se muestra el promedio de la expresión de cuatro muestras biológicamente independientes.

A



B

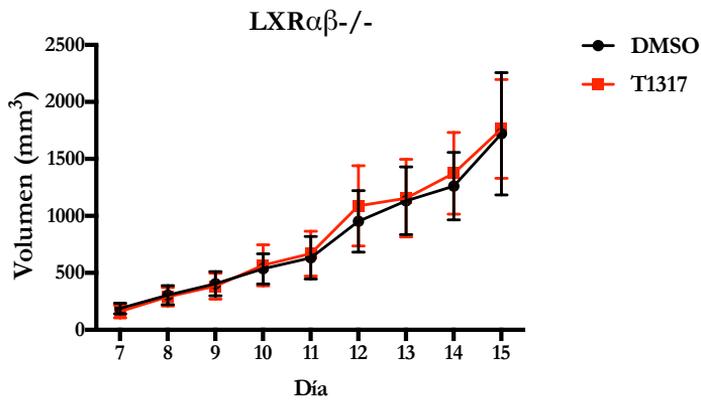


Figura 30. La activación de LXR inhibe el crecimiento tumoral in vivo. Ratones macho C57BL/6 WT A) y LXR $\alpha\beta$ -/- B) fueron inoculados con 3×10^6 células 3LLR por inyección subcutánea y se dejó establecer el tumor durante 7 días. Desde el día 7 hasta el día 15 se trataron los ratones con vehículo (DMSO) o T1317 (15 mg/kg) diariamente vía intraperitoneal y se tomaron medidas de anchura y altura del tumor con las que se determinó el volumen. El gráfico muestra el promedio del volumen tumoral \pm SEM de 14 individuos por grupo experimental en WT; y 8 (DMSO) y 9 (T1317) individuos en LXR $\alpha\beta$ -/-. Anova de dos factores con mediciones repetidas, ** p-valor < 0,01 vs DMSO.

Por un lado, evaluamos si el tratamiento con T1317 altera la abundancia de algunas poblaciones de células del sistema inmunitario en el tumor, con especial interés en la principal población leucocitaria en el microambiente tumoral, los macrófagos. Para ello, inoculamos las células 3LLR en ratones WT y dejamos establecer el tumor durante 7 días. A partir del séptimo día y hasta el día 15 se administró T1317. A día 15, los animales fueron sacrificados. Se extirparon los tumores y se procesaron para obtener una suspensión celular. Se analizó la presencia de diferentes poblaciones mieloides por citometría de flujo usando anticuerpos contra los marcadores CD11b, Ly6G, Ly6C y MHCII.

De las células CD11b⁺ diferenciamos entre las que son Ly6G⁺ que representan granulocitos, básicamente neutrófilos, y las que son Ly6G⁻ que corresponden al linaje monocítico. En esta población CD11b⁺ Ly6G⁻ analizamos la expresión de Ly6C y MHCII y diferenciamos 4 poblaciones. La población Ly6C^{High} MHCII^{Low}, que corresponde a monocitos inmaduros; las poblaciones Ly6C^{Low} MHCII^{Low} y Ly6C^{Low} MHCII^{High} que corresponden a dos poblaciones diferentes de macrófagos tumorales (TAM) MHCII^{Low} TAM y MHCII^{High} TAM respectivamente; y finalmente una población Ly6C^{Low} MHCII^{Bright} con una expresión de MHCII mayor que los MHCII^{High} TAM que corresponde a células dendríticas asociadas a tumor (TADC) (figura 13). En la figura 31 podemos observar que el tratamiento *in vivo* con T1317 no altera significativamente los porcentajes de las poblaciones mieloides analizadas.

Por otro lado, nos preguntamos si los LXR podrían estar alterando la producción de mediadores inmunitarios por parte de las células del sistema inmunitario presentes en el tumor. Estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio nos habían revelado que los LXR tienen la capacidad de reprimir la expresión de las quimiocinas Ccl17 y Ccl22 en macrófagos derivados de médula ósea activados por IL-4 (León, 2013). Curiosamente, los macrófagos asociados a tumor producen elevadas cantidades de estas quimiocinas, lo que promueve el reclutamiento de linfocitos Treg que inducen un ambiente inmunosupresor que favorece el desarrollo tumoral. En particular, los MHCII^{High} TAM expresan abundantes niveles de Ccl17 (Movahedi et al., 2010).

Por este motivo estudiamos si el tratamiento con T1317 podía reducir la expresión de Ccl17 y Ccl22 en los macrófagos asociados a tumor, y por ende, la concentración de estas quimiocinas en el microambiente tumoral. Para ello, tras extirpar y disgregar los tumores de animales tratados con vehículo (DMSO) o con T1317, obtuvimos muestras de sobrenadante y, posteriormente, incubamos la suspensión tumoral con anticuerpos unidos a fluoróforo contra los marcadores CD11b, Ly6G, Ly6C y MHCII. Siguiendo la estrategia de *gating* que se muestra en la figura 13, seleccionamos las poblaciones MHCII^{Low} TAM y MHCII^{High} TAM y las aislamos mediante un separador celular. Posteriormente realizamos el análisis de la expresión génica de Ccl17 y Ccl22 mediante qPCR.

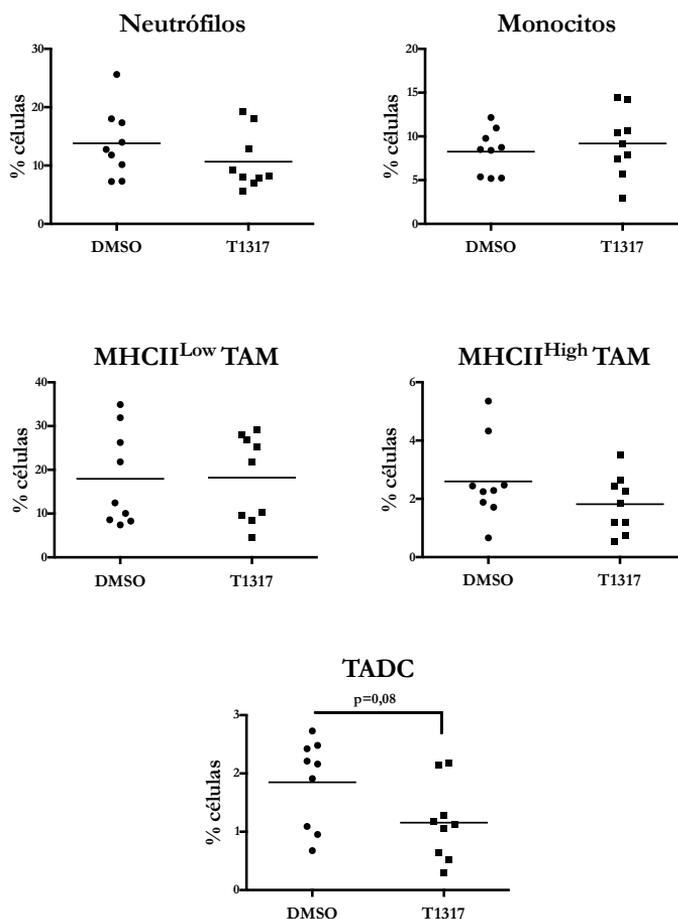


Figura 31. La activación de LXR no afecta a los porcentajes de poblaciones mieloides presentes en el microambiente tumoral. Ratones machos C57BL/6 WT fueron inyectados con 3×10^6 células por vía subcutánea y se dejó establecer el tumor durante 7 días. Desde el día 7 hasta el día 15 se trataron los ratones con vehículo (DMSO) o T1317 (15 mg/kg) diariamente vía intraperitoneal. Posteriormente se extirpó el tumor y se obtuvo una suspensión celular que fue incubada con anticuerpos acoplados a fluoróforo contra los siguientes marcadores: CD11b, Ly6G, Ly6C y MCHII. Se analizaron las distintas poblaciones celulares mediante citometría de flujo. Los gráficos muestran el promedio del porcentaje de células de 9 ratones por grupo experimental. Se realizó un test U de Mann-Whitney y se consideraron diferencias significativas con un p-valor $< 0,05$.

En la figura 32A podemos apreciar como el tratamiento *in vivo* con el agonista T1317 reprime significativamente la expresión de Ccl17 en las células MHCII^{High} TAM. Esta represión se observó en un segundo experimento realizado independientemente (datos no mostrados). En cambio, en los MHCII^{High} TAM deficientes para LXR el tratamiento con T1317 no reprime la expresión de Ccl17 en las células MHCII^{High} TAM (figura 32B). Además, observamos una tendencia de represión de Ccl17 en las células MHCII^{Low} TAM y del gen Ccl22 en las células MHCII^{High} TAM (figura 32A).

Tal como mencionamos más arriba, el tratamiento con T1317 afecta en menor medida a la expresión de Ccl17 en los MHCII^{Low} TAM que en los MHCII^{High} TAM. Cabe destacar que las células MHCII^{Low} TAM se encuentran habitualmente ubicadas en regiones hipóxicas del tumor y, por lo tanto, podrían estar menos expuestas al agonista administrado por vía intraperitoneal. Por este motivo, aislamos MHCII^{Low} TAM de tumores de dos semanas de edad y los estimulamos *ex vivo* durante 18 horas con T1317. Posteriormente evaluamos la expresión de Ccl17 y Ccl22. En la figura 33 vemos que el tratamiento con LXR reprime significativamente la expresión de ambas quimiocinas en los MHCII^{Low} TAM.

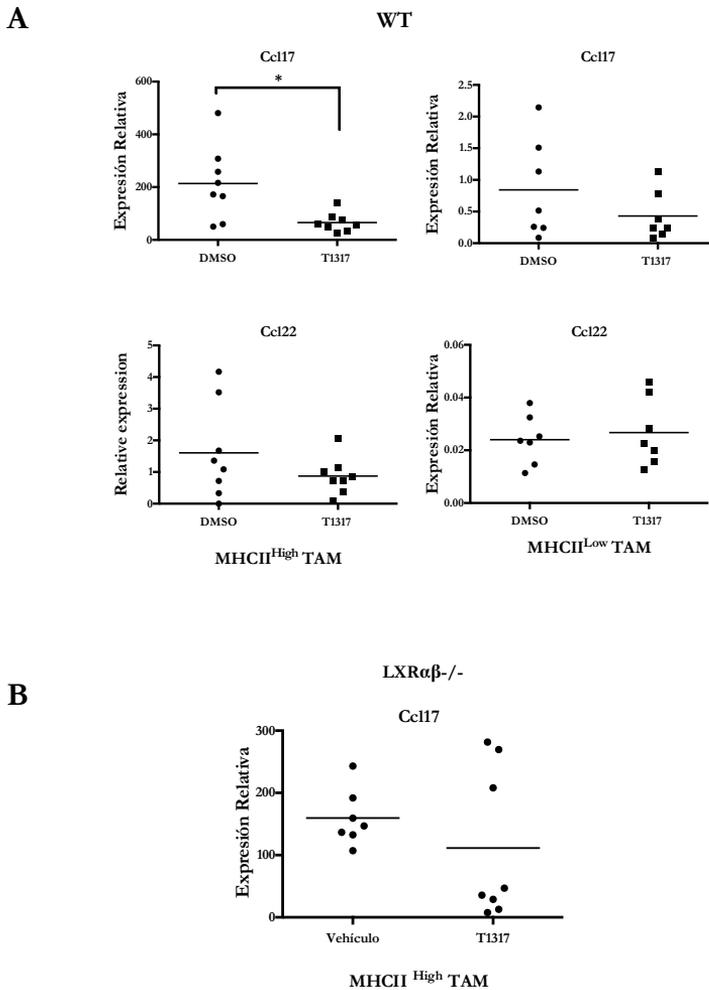


Figura 32. LXR reprime in vivo la expresión de CCL17 en MHCII^{High} TAM. Ratones macho C57BL/6 WT A) y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} B) fueron inoculados con 3×10^6 células 3LLR por vía subcutánea y se dejó establecer el tumor durante 7 días. Desde el día 7 hasta el día 15 se trataron los ratones con vehículo (DMSO) o T1317 (15 mg/kg) diariamente vía intraperitoneal. Posteriormente se extirpó el tumor y se generó una suspensión celular que se incubó con anticuerpos unidos a fluoróforo contra los marcadores CD11b, Ly6G, Ly6C y MHCII y se aislaron las poblaciones MHCII^{Low} TAM y MHCII^{High} TAM mediante un separador celular. Se purificó el ARN total y se cuantificó la expresión de CCL17 y CCL22 mediante PCR cuantitativa. Los valores de expresión de estas quimiocinas se normalizaron por los valores de expresión del gen L14. Los gráficos muestran el promedio de la expresión relativa de Ccl17 y Ccl22 7-8 ratones. Para el análisis estadístico se realizó una prueba T. *p-valor < 0,05.

MHCII^{Low} TAM

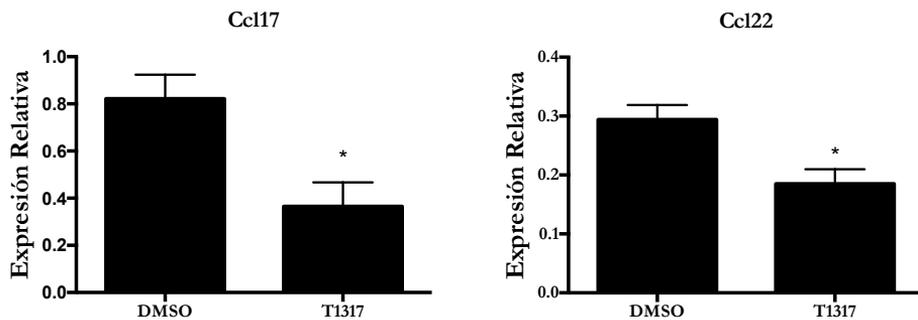


Figura 33. La activación de LXR ex vivo reprime la expresión de Ccl17 y Ccl22 en MHCII^{Low} TAM. Los tumores de 15 días de edad de ocho ratones fueron extirpados y procesados conjuntamente para generar una suspensión celular de la que se separaron los macrófagos tumorales mediante un separador celular. Estos macrófagos fueron incubados en medio ME (ver materiales y métodos) y estimulados con vehículo (DMSO) o T1317 (1 μ M) durante 18 horas. Se extrajo ARN total y se cuantificó la expresión génica mediante PCR cuantitativa. Los datos fueron normalizados con la expresión de L14. Los gráficos muestran el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. Se realizó un test T-Student. * p-valor < 0,05 vs DMSO.

Además, mediante ELISA, cuantificamos la concentración de Ccl17 en los sobrenadantes obtenidos de cada tumor. Como se aprecia en la figura 34 el tratamiento *in vivo* con T1317 redujo significativamente la concentración de CCL17 en el microambiente tumoral.

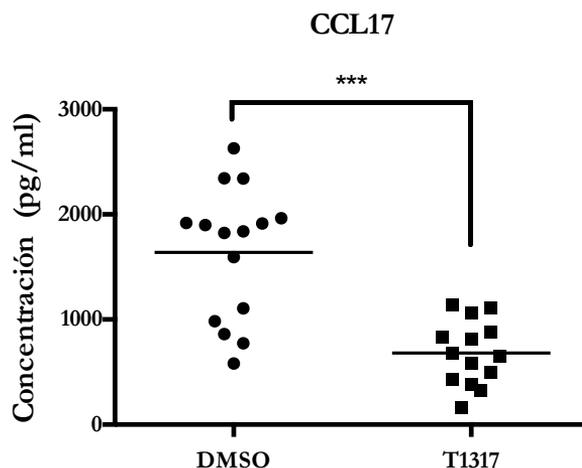


Figura 34. La activación de LXR reduce la concentración de CCL17 en el microambiente tumoral. Ratones macho C57BL/6 WT fueron inoculados con 3×10^6 células 3LLR por vía subcutánea y se dejó establecer el tumor durante 7 días. Desde el día 7 hasta el día 15 se trataron los ratones con vehículo (DMSO) o T1317 (15 mg/kg) diariamente vía intraperitoneal. Posteriormente se extirpó el tumor y se disgregó en medio RPMI. Se obtuvo una muestra de sobrenadante de la que se cuantificó la concentración de CCL17 mediante ELISA. El gráfico muestra el promedio de la concentración de CCL17 normalizada por el peso del tumor de 14-15 ratones. Se realizó un test U de Mann-Whitney, $***p < 0,001$ vs DMSO.

Llegados a este punto, nos pareció interesante explorar los mecanismos involucrados en el control de la expresión de Ccl17 y Ccl22 en los macrófagos. Las dos poblaciones de macrófagos estudiadas (MHCII^{Low} TAM y MHCII^{High} TAM) tienen fenotipos distintos, siendo los MHCII^{Low} TAM cercanos a los macrófagos activados de manera alternativa y los MHCII^{High} TAM cercanos a un perfil clásico o pro-inflamatorio. De hecho, en el microambiente tumoral existen abundantes niveles de IL-4, uno de los

estímulos por excelencia para la inducción del fenotipo alternativo, y de GM-CSF, citoquina que afina fenotipo pro-inflamatorio de los MHCII^{High} TAM (Van Overmeire et al., 2016). En experimentos realizados con macrófagos derivados de médula ósea hemos observado la inducción de Ccl22 y Ccl17 tanto en respuesta a IL-4 como a GM-CSF. Además, la co-estimulación con ambas señales conlleva una inducción sinérgica de la expresión de dichas quimiocinas (figura 35).

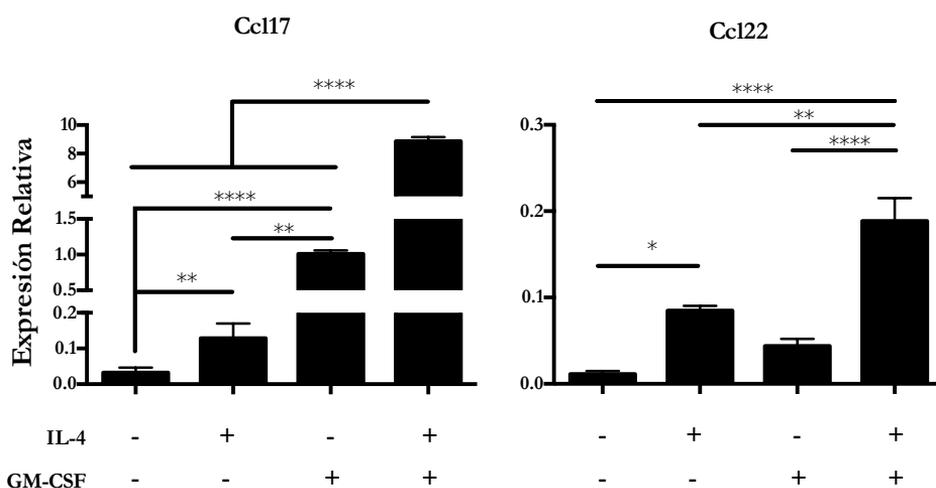


Figura 35. IL-4 y GM-CSF inducen la expresión de Ccl17 y Ccl22. Macrófagos de médula ósea fueron incubados en DMEM suplementado con un 10% de FCS y estimulados con IL-4 (10 ng/ml) y/o GM-CSF (5ng/ml) durante 8 horas. Se extrajo ARN total y se midió la expresión génica mediante PCR cuantitativa. El gráfico muestra el promedio +/- SEM de 3-4 experimentos independientes. Se realizó un test de Anova más un test de Bonferroni de comparaciones múltiples. * p-valor<0,05, **** p-valor<0,0001.

Como ya hemos mencionado, en trabajos realizados con anterioridad a esta tesis descubrimos que los LXR tienen la capacidad de reprimir la inducción por IL-4 de las quimiocinas Ccl17 y Ccl22, resultados que han sido confirmados en este trabajo de manera independiente (figura 36).

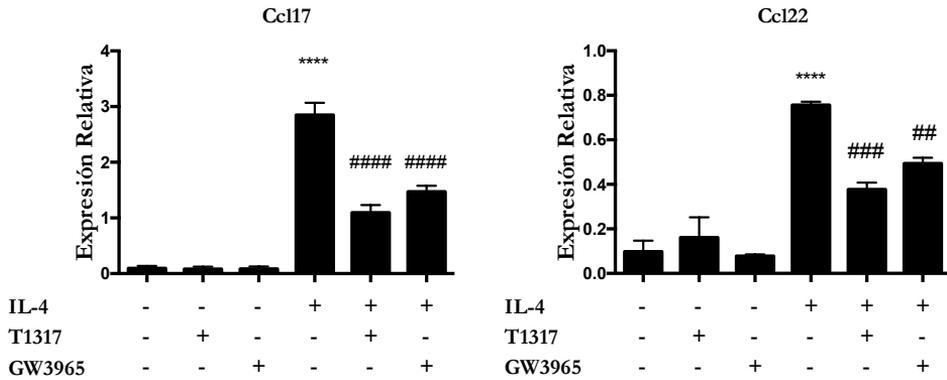


Figura 36. Los agonistas de LXR reprimen la inducción por IL-4 de la expresión de Ccl17 y Ccl22. Macrófagos derivados de médula ósea fueron cultivados en medio DMEM suplementado con 10% de suero y pre-estimulados con los agonistas de LXR T1317 o GW3965 (1µM) durante 18 horas. Posteriormente se añadió IL-4 (10 ng/ml) durante 24 horas. La expresión génica se midió por PCR cuantitativa normalizando con el gen L14. Los gráficos muestran el promedio +/- SEM de 3-4 experimentos independientes. Se realizó un test de Anova más un test de comparaciones múltiples de Bonferroni. **** p-valor<0,0001 vs DMSO., ## p-valor<0,01, ### p-valor<0,001, #### p-valor<0,0001 vs IL-4.

Además, nos preguntamos si los LXR también tendrían la capacidad de reprimir la inducción de estas quimiocinas por GM-CSF. Incubamos con GM-CSF macrófagos pre-tratados con los agonistas de LXR y evaluamos la expresión de las quimiocinas. De manera similar a lo que ocurre con la inducción por IL-4, los agonistas de LXR reprimieron la inducción por GM-CSF de Ccl17 y Ccl22 (figura 37).

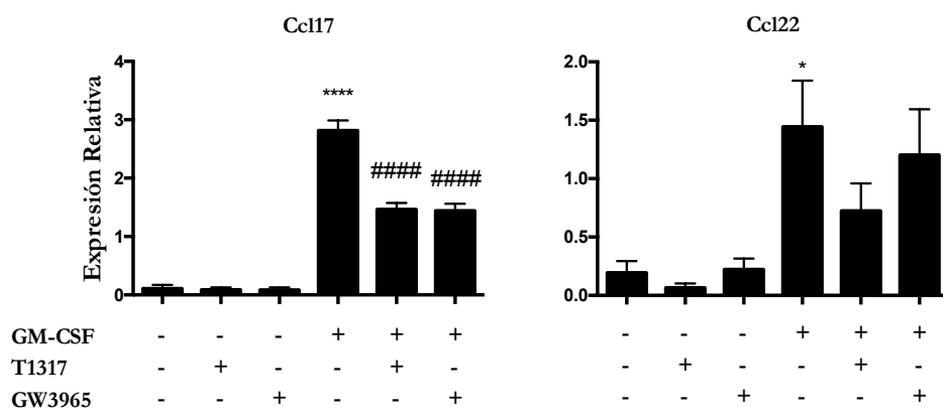


Figura 37. Los LXR reprimen la inducción por GM-CSF de la expresión de Ccl17 y Ccl22. Macrófagos derivados de médula ósea fueron incubados en medio DMEM suplementado con un 10% de FCS y pre-tratados con los agonistas de LXR T1317 y GW3965 (1 μ M) durante 18 horas. Posteriormente se añadió GM-CSF (5 ng/ml) durante 24 horas. Se extrajo el ARN total y se cuantificó la expresión génica mediante PCR cuantitativa. Los gráficos muestran el promedio +/- SEM de 3-4 experimentos. Se realizó un test de Anova más un test de Bonferroni de comparaciones múltiples. * p-valor<0,05, **** p-valor<0,0001 vs control; # p-valor<0,05 vs GM-CSF.

En los estudios previos sobre el papel de los LXR sobre la activación alternativa de macrófagos, ya se había empezado a explorar los mecanismos de regulación de la expresión de *Ccl17* y *Ccl22*, y qué papel pueden estar jugando los LXR en esta regulación. Tres datos importantes obtenidos en ese trabajo nos han ayudado a proseguir con nuestra investigación. Primero, que la inducción de *Ccl17* y *Ccl22* por IL-4 es totalmente dependiente de STAT6, pues esta inducción se pierde completamente en el ratón *Stat6*^{-/-}. Segundo, la represión de la inducción de las quimiocinas por IL-4 que se muestra en la figura 36 es dependiente de LXR, pues se pierde en el ratón *LXRαβ*^{-/-}. Y tercero, se descartó que la represión mediada por LXR se produzca a través de la alteración de la fosforilación de STAT6 (León, tesis doctoral, 2013).

En la vía de señalización de IL-4, STAT6 regula la expresión de una primera oleada de genes. Algunos de estos genes tempranos son factores de transcripción que regularán a continuación la expresión de un segundo subconjunto de genes de respuesta a IL-4. Uno de los genes inducidos de forma temprana es el factor de transcripción IRF4 (Gupta et al., 1999). Por lo tanto, de entrada decidimos evaluar si la inducción de *Ccl17* y *Ccl22* por IL-4 dependía del factor IRF4. Para ello, estimulamos con IL-4 macrófagos derivados de médula ósea procedentes de ratones WT y ratones deficientes en IRF4 y determinamos la expresión de estas quimiocinas. En la figura 38A podemos ver como en los ratones *Irf4*^{-/-} se pierde la inducción por IL-4 de *Ccl17* y *Ccl22*, lo que indica que IRF4 es imprescindible en la regulación por IL-4 de la expresión de estas dos quimiocinas. A continuación nos preguntamos si la inducción de *Ccl17* y *Ccl12* por GM-CSF también sería dependiente de *Irf4*. Para ello, tratamos macrófagos derivados de médula ósea de ratones WT y ratones *Irf4*^{-/-} con GM-CSF y evaluamos la expresión de las quimiocinas mediante PCR cuantitativa. Como se puede apreciar en la

figura 38B, la inducción es dependiente de IRF4 pues se pierde en los macrófagos *Irf4*^{-/-}. IRF4 es un factor de transcripción que puede regular la expresión génica a través de su unión con otros factores de transcripción que actúan comoco-reguladores, como algunos miembros de la familia Jun (P.Li et al, 2012). No obstante, mediante la utilización de ratones deficientes para JunD y JunB, descartamos que la inducción de Ccl17 y Ccl22 por IL-4 o GM-CSF esté mediada por estos factores de transcripción (figura 38C, D, E y F).

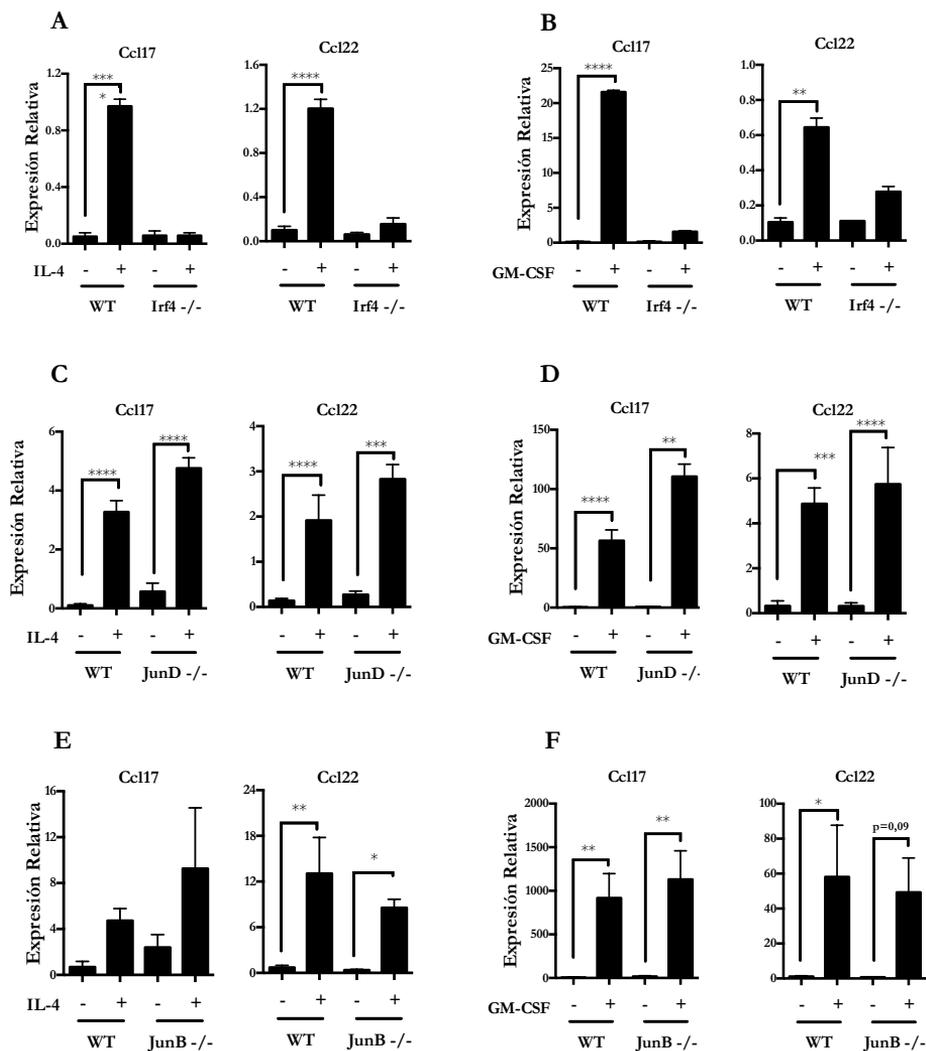


Figura 38. La inducción de Ccl17 y Ccl22 por IL-4 o GM-CSF es dependiente de IRF4 e independiente de JunD y JunB. Macrófagos derivados de médula ósea de ratones WT, ratones IRF4 -/-, ratones JunD -/- y ratones JunB -/- fueron incubados en medio DMEM suplementado con un 10% de FCS y estimulados con IL-4 (10 ng/ml)(A,C y E) o GM-CSF (5ng/ml)(B, D y F) durante 24 horas. Se extrajo ARN total y se cuantificó la expresión génica mediante PCR cuantitativa, normalizando con el gen L14. Los gráficos muestran el promedio de 2-5 experimentos independientes +/- SEM. Se realizó un test de Anova más un test de comparaciones múltiples de Bonferroni. * p-valor<0,05, ** p-valor<0,01, *** p-valor<0,001, **** p-valor<0,0001.

Dado que *Irf4* resultó ser un regulador común en la inducción de las quimiocinas por IL-4 y GM-CSF, la siguiente pregunta que nos planteamos fue si LXR estaría actuando a través de IRF4 para reprimir la inducción de *Ccl17* y *Ccl22*. En primer lugar, decidimos evaluar si los LXR afectan la inducción de *Irf4*. Por un lado, estimulamos los macrófagos con IL-4 durante diferentes tiempos en presencia o ausencia de un pre-tratamiento con T1317 o vehículo (DMSO) y evaluamos la expresión de *Irf4* (figura 39). Los resultados obtenidos indican que, el máximo de inducción por IL-4 de *Irf4* tiene lugar pronto, entre las 2 y 4 horas. Sorprendentemente, el pre-tratamiento con T1317 reduce significativamente la inducción de *Irf4*.

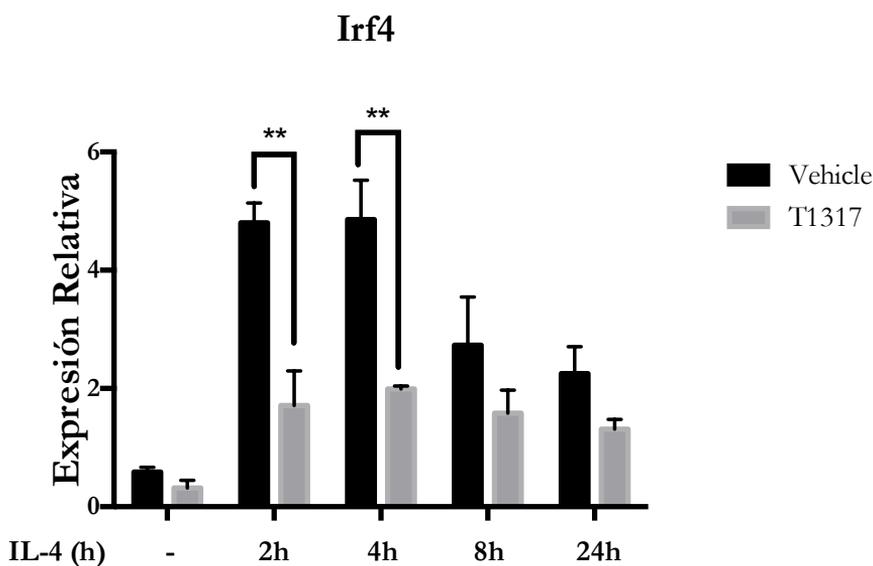


Figura 39. T1317 reprime la inducción por IL-4 de la expresión de *Irf4* por IL-4. Macrófagos derivados de médula ósea fueron pre-estimulados con T1317 (1 μ M) durante 18 horas y, a continuación, estimulados con IL-4 (10 ng/ml) durante 2, 4, 8 y 24 horas. Se extrajo ARN total y se cuantificó la expresión génica mediante PCR cuantitativa. El gráfico muestra el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. Se realizó un test de Anova de dos factores más un test de Bonferroni de comparaciones múltiples. ** p-valor<0,01.

A continuación evaluamos si sucede lo mismo cuando estimulamos las células con GM-CSF. Como podemos ver en la figura 40, GM-CSF induce la expresión de Irf4 y los agonistas de LXR reprimen esta inducción.

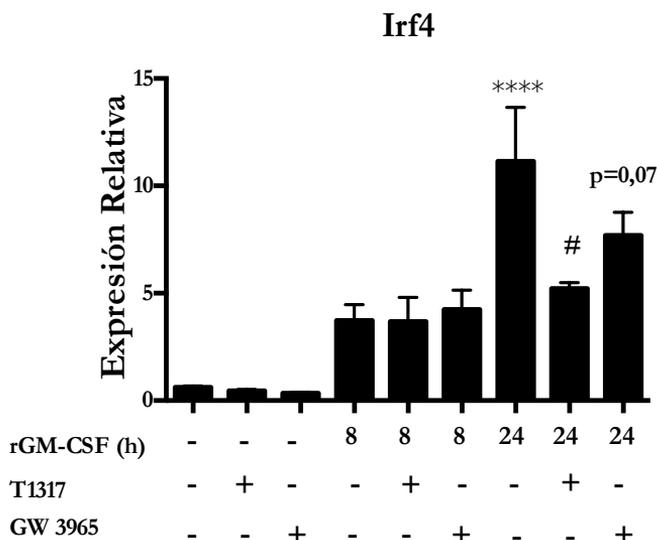


Figura 40. Los agonistas de LXR reprimen la inducción por GM-CSF de la expresión de Irf4. Macrófagos derivados de médula ósea fueron incubados en medio DMEM suplementado con un 10% de FCS y pre-tratados con los agonistas de LXR T1317 y GW3965 (1 μ M) durante 18 horas. Posteriormente se añadió GM-CSF (5 ng/ml) durante 8 ó 24 horas. Se extrajo el ARN total y se cuantificó la expresión génica mediante PCR cuantitativa. Los gráficos muestran el promedio \pm SEM de 4 experimentos. Se realizó un test de Anova más un test de Bonferroni de comparaciones múltiples. **** p-valor<0,0001 vs control; # p-valor<0,05 vs GM-CSF.

Recientemente se ha descrito que GM-CSF aumenta la expresión de IRF4 en monocitos humanos a través de la inducción de la demetilasa JMJD3 (Achuthan et al., 2016). Sin embargo, en macrófagos murinos la activación de LXR no reprime la inducción de Jmjd3 en respuesta a GM-CSF o IL-4 (figura 41), de manera que descartamos que los efectos inhibitorios de LXR sobre Irf4 se estén produciendo de forma indirecta a través de Jmjd3.

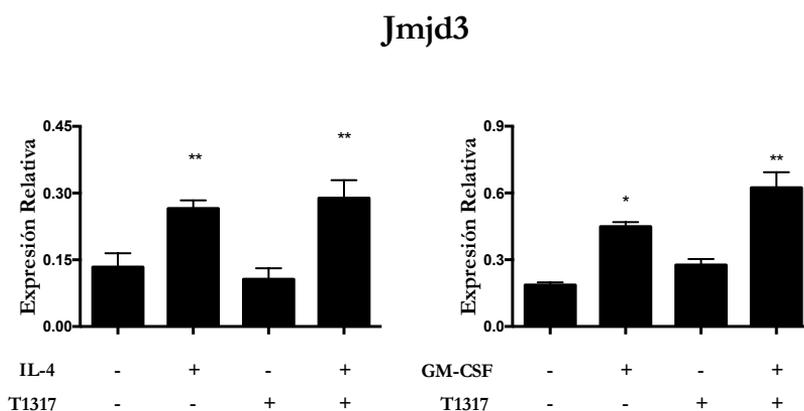


Figura 41. Los LXR no reprimen la expresión de Jmjd3. Macrófagos derivados de médula ósea fueron incubados en medio DMEM suplementado con un 10% de FCS y pre-tratados con T1317 (1 μ M) durante 18 horas. Posteriormente se añadió GM-CSF (5 ng/ml) o IL-4 (10 ng/ml) durante 2 horas. Se extrajo el ARN total y se cuantificó la expresión génica mediante PCR cuantitativa. Los gráficos muestran el promedio \pm SEM de 3 (GM-CSF) y 6 (IL-4) experimentos. Se realizó un test de Anova más un test de Bonferroni de comparaciones múltiples. * p-valor<0,05, ** p-valor<0,01 vs control.

Estos resultados sugieren que, LXR podría reprimir la inducción de Ccl17 y Ccl22 mediante una inhibición de la expresión de Irf4. En los estudios previos a esta tesis mencionados anteriormente (tesis doctoral, León, 2013) se determinó que el tratamiento con los agonistas de LXR no afectaba la inducción por IL-4 de ciertos marcadores típicos de activación alternativa. En base a esas observaciones, analizamos si Irf4 participa en la regulación de marcadores de activación alternativa no afectados por los agonistas LXR. Como se puede apreciar en la figura 42, la inducción por IL-4 de Ym1, Mgl1, Mrc1 y Arg1 es independiente de Irf4. Estos resultados refuerzan la idea de que los LXR, a través de la represión de la inducción de Irf4, inhiben de forma selectiva la expresión de Ccl17 y Ccl22. Para confirmar esta hipótesis, llevamos a cabo estudios de actividad de regiones reguladoras en la cercanía de los genes que codifican para Ccl17 y Ccl22. En primer lugar, analizamos datos de ChIPseq contra IRF4 disponibles en la literatura en los que se había analizado la unión de IRF4 a lo largo del genoma en linfocitos T (Ciofani et al., 2012). Centramos nuestra atención en la región genómica en la que se encuentran los genes que codifican para Ccl17 y Ccl22. En la figura 43 se muestra una región de aproximadamente 200 kb localizada en el cromosoma 8 murino en la que se localizan estos dos genes, separados entre sí aproximadamente por 62 kb. Se muestran tres pistas de ChIPseq en las que se aprecia el reclutamiento de IRF4 en linfocitos T WT sin estimular (Th0) y tras la diferenciación a Th17, pero no en linfocitos T Irf4 -/-.

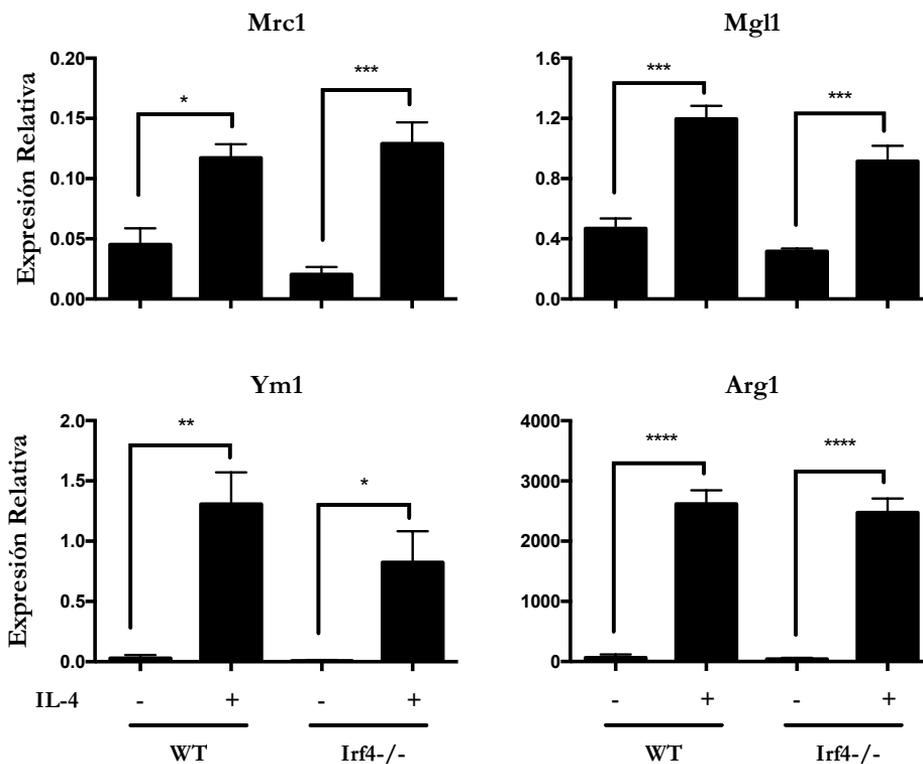


Figura 42. La inducción por IL-4 de Ym1, Mgl1, Mrc1 y Arg1 es Irf4 independiente.

Macrófagos derivados de médula ósea de ratones WT y ratones IRF4 ^{-/-} fueron incubados en medio DMEM suplementado con un 10% de FCS y estimulados con IL-4 (10 ng/ml) durante 24 horas. Se extrajo ARN total y se cuantificó la expresión génica mediante PCR cuantitativa, normalizando con el gen L14. Los gráficos muestran el promedio de 4 experimentos independientes +/- SEM. Se realizó un test de Anova más un test de comparaciones múltiples de Bonferroni. * p-valor<0,05, ** p-valor 0,01, *** p-valor<0,001, **** p-valor<0,0001.

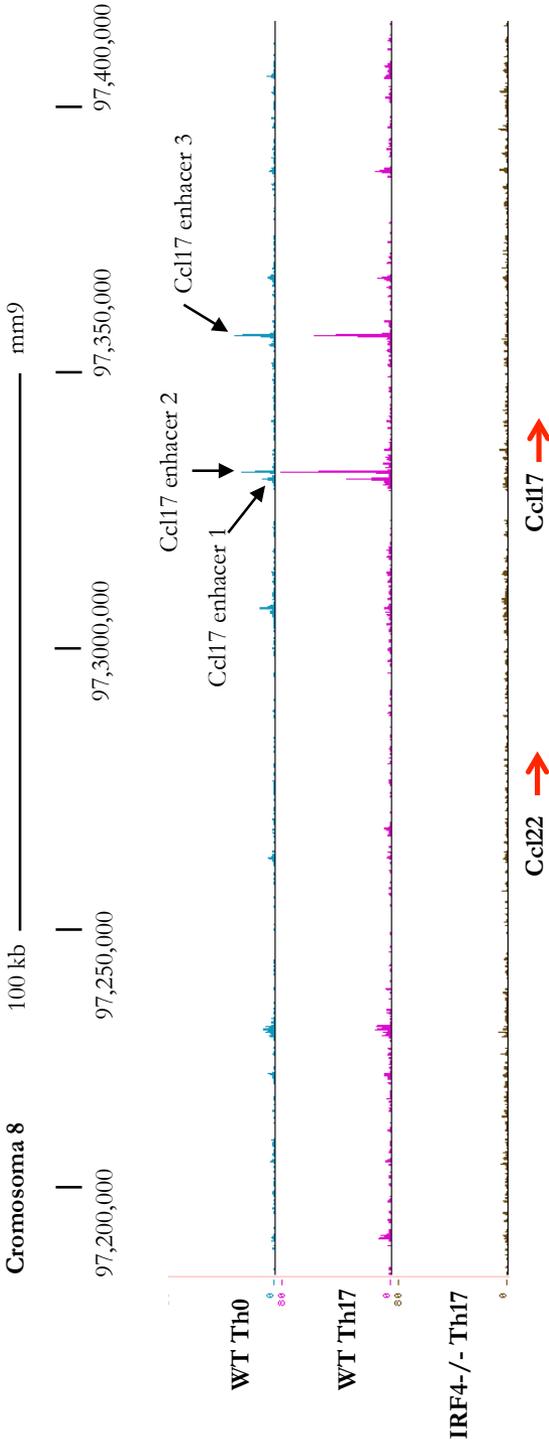


Figura 43. IRF4 aparece reclutado en tres regiones cercanas a Ccl17 durante la diferenciación de linfocitos Th17. Pistas de ChIPseq de unión de IRF4 al locus de Ccl17 y Ccl22 en linfocitos T CD4 naïve (Th0) y diferenciados a Th17 durante 48 horas. Este análisis ha sido llevado a cabo a partir de los datos de ChIPseq depositados en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE40918> (Ciofani et al., 2012).

En las muestras WT podemos apreciar tres regiones o picos, que hemos llamado Ccl17 enhancer 1, 2 y 3, en las que se producen un reclutamiento de IRF4 cerca de la región genómica que codifica para Ccl17 durante la transición de Th0 a Th17. Este reclutamiento es específico y desaparece en los linfocitos Irf4^{-/-}. Las regiones Ccl17 enhancer 1 y 2 están separadas entre sí por 850 pares de bases y se encuentran a una distancia de aproximadamente 6,5 kb *upstream* del punto de inicio de la transcripción de Ccl17. Por otro lado, la región Ccl17 enhancer 3 se encuentra aproximadamente 24 kb *downstream* de Ccl17. Estas tres regiones enhancer comprenden unas 500 bp cada una y en su secuencia encontramos múltiples sitios potenciales de unión a IRF4 (CTTT o GAAA) (figura 44). Estas regiones fueron clonadas en el vector pGL3 promoter, que contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor SV40 y que está indicado para el estudio de la actividad de regiones enhancer (ver materiales y métodos).

Ccl17 enhancer 1

TGAC**CTTT**GATCCTAAGAAGTGCCACCACCCATTAATGGTACACAAGAATCCCAAGCCA
GGCACCCAGCTTACCCACTGCTCCAACTCTTCTGCTGCACAGAGCACATGGAC**CTTT**G
CATCGTCTAGAGAGTTATGCTCAAGGGGTAACTATGCCAGGAAT**GAA**AGGGACAGC
CCCAGCCACCCAGAGGCAGAAAGGACATGGAGAGCCGGTGTGGT**CTTT**TCTAACC
GAGTGACACATGCCTGGGA**GAA**ACATGTTAAGGGGGAAAGGGCTTAGTGTAGCTTAG
GTTTT**CAGTGT**TTGACTCAGATCTGTGTTAAGTCATAAAGGCATGACAGAGGGACAT
GGTGGAGCAAGGTTGCTTGTCTCACAGAGGGAACGATGCAGAGGAAGTGAGATAAG
ATAGTTTTACAAAGACATACCTCCCCCTCCCCCAGGGATCCACTTCTTTACACAGGC
CCCATTTTCGCAGAGCCCATGTAGTACAAATTCATCAGTGGACAGACCTAAGAATGAA
GTTAGCACCCTTAGGA

Ccl17 enhancer 2

GTCCCAAG**CTTT**TAATCCCCCTTCTCAACCTCTTAGATATAACAGGTATAGCCTTGTA
TACAGGCTAGGTAGCAGTAGGA**GAA**AGTTCCAGGAGGAAGTGGGCCCATGGGTT
GGATTGTGTGGGTG**GAAAGGAA**AGATTGAGGTAGTGAATGAGGAGGAGGTGAG
GACAAGTGACTGAGCAGAGCCTCTGTCTGATGACGTGTGGGGGAAGCAGGCCAGGA
ATGAGTCAAGGGCAGAGCTTCAGACTGGGTGGTGACAGGGAGGTGAGAGCGTGT
GGGTGAG**GAA**AGGGGGAAAGCCGGTTGGAGAGGGAGCTCGGCTCAGGCTGA
ATGGATGCAGAGGGCATGACATTCTGT**CTTT**CGGGAACATATCCATCCATTCAATAAC
GGGACAACCTCACAGTTACCAGATGGCAGCGAGGGGAAGGGTTGAGGAACCTCACAG
ATAGACAGGTGAATGAGCGAGAAGCAGCCGGTCCCTGAGGTCAGCATC

Ccl17 enhancer 3

ACATGACGACT**GAA**ACATGG**GAA**ACAGTAACAGGCAGAATGA**GAA**TGA
GCACACAGACATGCACACAATTTTTTAGGCAGAA**GAA**ACACAGGTTTTGT
GTTTAAGCATCTAAACAGGACGTATCCTGGAGGGTGTTCACCAAAAATCA
GACCAACAGGTCCCTGTGGTTACGGCTCTGACAGAACATTACAGTAACATC
TACAGGGGCTGCAGCAAGGGAGTGAGGAGGAGCAGGTACAGTGATGTACA
T**GAA**AGGTCATGACAAAAACC**CTTT**TTTTCTGTATGAGTGTTCATGTATGA
AAATGCTATCACCGTTGTGAGGTCTCCTGAGGGCAAACCCATCCATCCTC
CCAGGGCCTGAGAGACTTCATCAACTGAA**GAA**TGACTCAGGCAGTCCTC
CCCGCCACCCTCCCCGCCACACACAGAAGAGTACCCCCAGCTGGTCTTA
CCTGAAGAAGACTTCTTGTGGGAAG**CTTT**AGCTGGCTAGAAGAACCCAC
TTCAAAGTTTGGCTTCTTGCCAGTGACACGGACTGAGCGCAGGCTGTAC
TGTGGTAGCCAGGTGCTCCTGCACGGACTGTACCTCCTCAGGGCTTAAG
GCCTCCCTCTGCAACTGCAATTGAAGACATCCACGAATCAGTGCACGCT

Figura 44. Secuencia de las regiones Ccl17 enhancer 1, 2 y 3. Se muestran en rojo los lugares de unión putativos para IRF4.

Para realizar los estudios de actividad de promotor, transfectamos la línea celular de macrófagos RAW264.7 con los plásmidos que contienen las secuencias Ccl17 enhancer 1, 2 ó 3. Una vez transfectadas, las células fueron pre-tratadas durante 18 horas con vehículo (DMSO) o con los agonistas T1317 o GW3965 y posteriormente, incubadas con IL-4 durante 24 horas manteniendo la presencia de los agonistas de LXR. Finalmente se evaluó la actividad luciferasa. En estos estudios no detectamos actividad de las regiones Ccl17 enhancer 1 o Ccl17 enhancer 3 (datos no mostrados). Sin embargo, sí que observamos una fuerte inducción de la actividad luciferasa en el plásmido que contenía la región Ccl17 enhancer 2 (figura 45). También se puede apreciar como el tratamiento con los agonistas T1317 o GW3965 reprime significativamente la inducción por IL-4 de la actividad del enhancer. Para comprobar si que los efectos represores de los LXR se dan a través de la represión de la expresión Irf4, co-transfectamos las células con un plásmido (pMIG-IRF4) que expresa de forma constitutiva Irf4. En estas condiciones, la sobreexpresión de Irf4 induce la actividad de la región Ccl17 enhancer 2 en ausencia de la estimulación por Il-4, confirmando que este enhancer se regula por Irf4. Además, la expresión constitutiva de Irf4, impide que los agonistas de LXR puedan de reprimir la actividad de la región Ccl17 enhancer 2.

Ccl17 enhancer 2

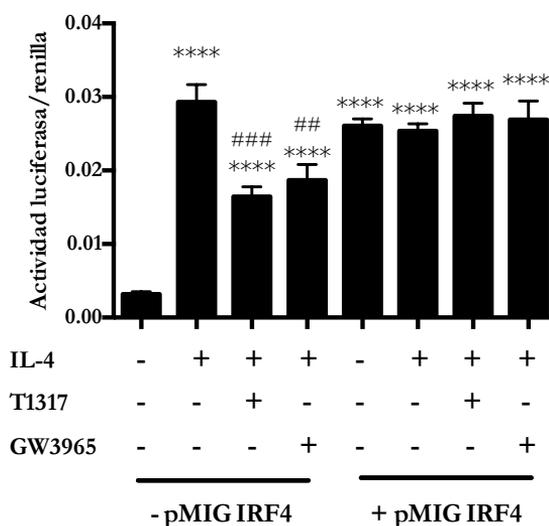


Figura 45. Los agonistas de LXR reprimen la actividad de la región Ccl17 enhancer 2.

Células RAW 264.7 fueron transfectadas con el plásmido que contiene la secuencia Ccl17 enhancer 2 +/- un plásmido pMIG-IRF4 que expresa IRF4 de forma constitutiva. Además co-transfectamos las células con un plásmido de expresión de LXR α y con un plásmido de expresión de renilla. Tras la transfección, las células fueron incubadas en medio DMEM suplementado con un 10% de FCS y pre-tratadas con los agonistas de LXR T1317 o GW3965 (1 μ M) durante 18 horas. Posteriormente añadimos IL-4 (10 ng/ml) durante 24 horas. Finalmente evaluamos la actividad luciferasa. El gráfico muestra el promedio +/- SEM de la actividad luciferasa normalizada por la actividad renillarenilla de 7 (-pMIG IRF4) y 3 (+pMIG-IRF4) experimentos independientes. Realizamos un test de Anova más un test de comparaciones múltiples de Bonferroni. **** p-valor<0,0001 vs control (sin estímulo ni sobreexpresión de IRF4); ## p-valor<0,01, ### p-valor<0,001 vs IL-4.

En base a estas conclusiones, analizamos también la expresión de *Irf4* en macrófagos tumorales tratados con T1317 (figura 46).

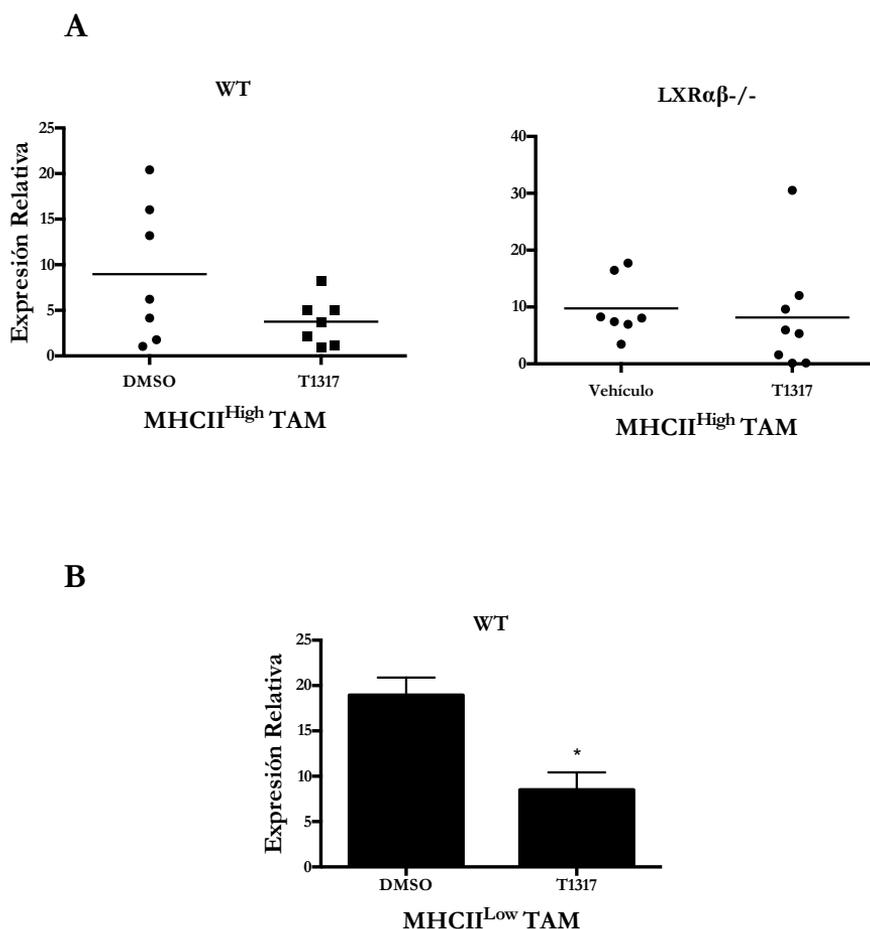


Figura46. Los LXR reprimen la expresión de *Irf4* en macrófagos tumorales. Se evaluó la expresión de *Irf4* por PCR cuantitativa en macrófagos aislados de tumores. (A) Se dejó establecer el tumor en ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} hasta el día 7 y desde el día 7 hasta el 15 se trataron los ratones con vehículo (DMSO) o T1317 (15 mg/kg) diariamente vía intraperitoneal. Se aislaron macrófagos tumorales tal y como se describe en materiales y métodos. El gráfico muestra el promedio de 7-8 ratones. (B) Se aislaron macrófagos a partir de tumores de 15 días de edad y se estimularon *ex vivo* con vehículo (DMSO) o T1317 (1 μ M) durante 18 horas. El gráfico muestra el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes en los que cada muestra procede de un pool de 8 animales. Tanto en A como en B se realizó una T-Student. * p-valor < 0,05 vs DMSO.

Como podemos apreciar en la figura 45A, en los macrófagos MHCII^{High} tratados *in vivo* con T1317, se aprecia una tendencia de represión de la expresión de Irf4, aunque esta no adquiere significancia estadística. Esta tendencia se pierde en los macrófagos MHCII^{High} LXR^{-/-}. Por otro lado, cuando tratamos macrófagos MHCII^{Low} *ex vivo* con T1317, se reprime significativamente la expresión de Irf4 (figura 45B), datos que correlacionan con los efectos inhibidores de T1317 sobre la expresión de Ccl17 y Ccl22 (figuras 32 y 33).

En su conjunto, este estudio indica que existe circuito mediado por LXR e IRF4 para la regulación negativa de quiomocinas importantes para el establecimiento de un entorno inmunosupresor en el tumor.

Discusión

Los LXR representan una potencial diana terapéutica de gran interés ya que, por un lado, participan en la regulación de una gran diversidad de procesos fisiológicos y celulares y, por el otro, pueden ser activados de manera eficiente mediante el uso de agonistas sintéticos con elevada especificidad y afinidad hacia ellos. En esta tesis nos hemos centrado en estudiar efectos de los agonistas de en el contexto del cáncer desde diferentes ópticas. En una primera parte hemos estudiado el rol de los LXR sobre la propia célula tumoral, centrándonos, por un lado, en los efectos sobre la capacidad proliferativa y, por el otro, sobre la expresión de genes que favorecen la metástasis. En la segunda parte de la tesis hemos evaluado el papel que los LXR ejercen sobre un aspecto importante del microambiente tumoral, la producción de quimiocinas mediada por macrófagos tumorales y cuya actividad es importante para el establecimiento de un entorno inmunosupresor.

Desde que Fukuchi y colaboradores realizaron los primeros estudios sobre los efectos de los agonistas de los LXR en células de cáncer de próstata (Fukuchi, et al., 2004), el interés por estudiar el papel anti-tumoral de este receptor tumoral es cada vez mayor. Varios estudios realizados durante la última década han demostrado que los LXR afectan la proliferación de diversas líneas tumorales (revisado en C. Lin & Gustafsson, 2015) y aún hoy en día los mecanismos subyacentes siguen siendo objeto de estudio (Youlin et al., 2017; Zhang, et al. 2016). En este trabajo hemos evidenciado que los agonistas de LXR también inhiben la capacidad proliferativa de dos líneas tumorales de cáncer de mama, las líneas LM2-4175 y BM-1833. Curiosamente, la concentración a la que los agonistas de LXR inhiben la proliferación en estas líneas tumorales (5-10 μM) es relativamente alta en comparación con las dosis a las que se obtiene una inhibición efectiva del

crecimiento celular en macrófagos primarios (1 μ M) (Pascual-García et al., 2011). De hecho, en la mayor parte de los estudios realizados hasta la fecha con células tumorales *in vitro* se han usado dosis elevadas de ligandos (Fukuchi et al., 2004; Vedin et al., 2009; Rough et al., 2010). Es interesante que, si transfectamos las células con un plásmido de expresión de LXR α , la sensibilidad de estas células al tratamiento aumenta, lo que nos sugiere que los efectos antiproliferativos se dan a través de la activación específica de los LXR. Sin embargo, no podemos descartar que al menos el agonista T1317 esté actuando, en parte, a través de la activación de otros receptores nucleares como los *farnesoid X receptor* (FXR) y los *pregnane X receptor* (PXR).

El análisis del ciclo celular nos ha revelado que el tratamiento con T1317 bloquea el paso de la fase G1 a la fase S. Mediante análisis masivo de expresión génica hemos determinado que el tratamiento con T1317 reprime la expresión de Skp2, resultado que fue posteriormente confirmado por PCR cuantitativa. La represión de este gen puede explicar el bloqueo de la transición G1 \rightarrow S, pues Skp2 regula positivamente la degradación del inhibidor del ciclo celular p27. Este mecanismo fue descrito anteriormente en células de cáncer de próstata y de ovario entre otras (Fukuchi et al., 2004; Rough, et al., 2010). Sin embargo, en las células LM2-4175 y BM-1833 los niveles de proteína p27 no se vieron afectados por el tratamiento con agonista. Estos resultados apoyan otros trabajos publicados en células de cáncer de mama en los que los agonistas de LXR reprimen Skp2 pero no afectan los niveles proteicos p27 (Vedin et al., 2009). Otro trabajo realizado en cáncer de mama propone que los LXR bloquean la proliferación mediante la represión de E2F (Nguyen-Vu et al., 2013). En nuestros datos de expresión génica, este gen no apareció afectado por el tratamiento con T1317. También hemos descartado que los LXR induzcan la expresión del gen MafB, que en

osteoclastos es responsable de la regulación negativa de la proliferación y cuya expresión está regulada, en parte, por los LXR a través de la inducción de SREBP1C (Menéndez-Gutiérrez et al., 2014).

El análisis de Gene Ontology de nuestros datos de expresión génica nos ha revelado que el tratamiento con T1317 está afectando la expresión de decenas de genes involucrados en el control del ciclo celular. Por lo tanto, es muy probable que los LXR estén regulando la proliferación de estas células por múltiples vías.

En nuestro trabajo, hemos detectado que el tratamiento con T1317 reprime la expresión del gen PMEPA1. Curiosamente, este gen está sobre-expresado en una gran variedad de cánceres, incluyendo tumores de mama, y suele ser un marcador de mal pronóstico (Vo Nguyen et al., 2014; Giannini et al., 2003). Además, en las células MDA-MB-231, este gen es responsable del papel pro-tumoral de la citoquina TGF β (Singha et al., 2010). Creemos que un estudio más a fondo sobre los efectos de la represión de Pmepa1 en células tumorales e incluso en células primarias podría ser de interés para entender los mecanismos anti-proliferativos del receptor nuclear LXR. En este sentido, el grupo pretende ampliar una línea de investigación en esta dirección.

Otra cuestión que hemos abordado en este trabajo es estudiar si los efectos de la activación de LXR sobre la expresión génica asociada a metástasis en las células LM2-4175 y BM-1833. Nuestra hipótesis de partida era que los LXR, a través de los mecanismos de represión de señales inflamatorias descritos con anterioridad (revisado en Pascual-García & Valledor, 2012), podrían modular la expresión de una batería de genes que conforman los

perfiles de expresión génica pro-metastáticos característicos de estas líneas celulares, y de esta manera modular su capacidad metastática. Nuestros resultados, sin embargo, nos han revelado que los LXR tienen discretos efectos sobre dichos perfiles de expresión, tanto en las células BM-1833 como en las células LM2-4175. No obstante, el papel de los LXR sobre la modulación de la metástasis es un tema candente. Durante el desarrollo de esta tesis se han publicado trabajos con resultados contrapuestos sobre el papel que los LXR ejercen sobre la metástasis en diferentes modelos tumorales. Por un lado, en el modelo de cáncer de mama PyMT, a pesar de que el tratamiento con el agonista GW3965 retrasa el desarrollo del tumor primario, incrementa significativamente la metástasis a pulmón (Nelson et al., 2013). En cambio, en diferentes subtipos de melanoma LXR β tiene la capacidad no solo de suprimir *in vivo* el desarrollo tumoral, sino de inhibir la formación de focos metastáticos en pulmón y cerebro. En estos estudios, se demostró que la inducción de ApoE por LXR β es suficiente para proteger a los ratones (Pencheva et al., 2014). Estos estudios han sido muy prometedores y, basándose en ellos, actualmente se están realizando ensayos clínicos para determinar la eficacia de un nuevo agonista de LXR, llamado RGX-104, para el tratamiento y la prevención de la metástasis derivada de melanoma (Kurth, 2016).

En el estudio 2 hemos analizado los efectos de la activación de LXR sobre el microambiente tumoral, centrándonos en la producción de quimiocinas relevantes para el establecimiento de un entorno inmunosupresor. De entrada, en animales inmunocompetentes, el agonista T1317 ejerce efectos anti-tumorales, con una disminución significativa del crecimiento tumoral. Cabe destacar que la administración del agonista de LXR fue llevada a cabo una vez ya se había establecido el tumor, aspecto que refuerza la relevancia

terapéutica del tratamiento con el agonista. Además, el efecto anti-tumoral requiere de la expresión de los LXR en células del microambiente tumoral diferentes de las propias células tumorales. Esta conclusión se deriva de los resultados obtenidos en ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ portadores de tumores WT, en los que el tratamiento con el agonista T1317 post-establecimiento del tumor no resulta en una disminución del crecimiento tumoral primario. Estas observaciones nos indican también que los efectos negativos observados *in vitro* sobre la proliferación de las propias células tumorales 3LLR no explican completamente el frenado del crecimiento tumoral en los ratones WT. De hecho, en estudios realizados en melanoma, también se ha observado una combinación de efectos sobre las células tumorales y sobre las células del microambiente por parte de los agonistas de LXR. En este sentido, la inducción de ApoE mediada por LXR e implicada en los efectos protectores contra la metástasis, ejerce acciones sobre la propia célula tumoral y también suprime el reclutamiento y migración de células endoteliales (Pencheva et al., 2014).

En nuestros estudios hemos analizado las proporciones de diferentes poblaciones mieloides en el tumor. No hemos visto cambios inducidos por el tratamiento con agonista en los porcentajes de neutrófilos, monocitos o macrófagos, aunque sí una tendencia a la reducción del porcentaje de células dendríticas. En un trabajo publicado anteriormente, se ha descrito la producción de agonistas de LXR endógenos por parte de algunos tumores. En dichos modelos, la expresión de $LXR\alpha$ era necesaria para reprimir la expresión del receptor CCR7 en células dendríticas y suprimir su migración hacia los ganglios linfáticos como mecanismo de inmuno-evasión. En dichos estudios, se propuso que la activación de LXR constituiría, por tanto, un mecanismo utilizado por el tumor en su propio beneficio, el cual frenaría la

capacidad de las células dendríticas de activar al sistema inmunitario adaptativo. Nuestros resultados, sin embargo, discrepan con este modelo, ya que la estimulación con un agonista sintético de LXR no supone una acumulación de células dendríticas en el microambiente tumoral ni tampoco favorece el crecimiento del tumor. (Villablanca et al., 2010).

En el presente trabajo, el agonista de LXR es capaz de reprimir *in vivo* la producción de la quimiocina Ccl17. Estos resultados se correlaciona con una represión de la expresión de Ccl17, a nivel de ARN, en la población MHCII^{High} TAM, que es gran productora de esta quimiocina en el microambiente tumoral. También hemos observado una tendencia de represión de la expresión de Ccl22 en los MHCII^{High} TAM. Que los efectos del agonista sean más evidentes en los MHCII^{High} TAM podría explicarse por el hecho de que este subtipo de macrófagos se ubica en las regiones normóxicas del tumor, y por lo tanto, recibe un aporte de sangre mayor que los MHCII^{Low} TAM, localizados en las regiones hipóxicas del tumor (Movahedi et al., 2010). Es posible en estas circunstancias que los MHCII^{Low} TAM tengan menos disponibilidad de ligando tras una administración del mismo vía intra-peritoneal. En este sentido, cuando hemos analizado la expresión de Ccl17 y Ccl22 en macrófagos tumorales tratados *ex vivo* con T1317, hemos constatado los efectos represores de los LXR sobre la expresión de estas quimiocinas también en los MHCII^{Low} TAM.

Las implicaciones de la represión de Ccl17 y Ccl22 en el microambiente tumoral pueden ser importantes. Niveles intra-tumorales elevados de Ccl17 están asociados con menor supervivencia en pacientes con carcinoma hepatocelular (Zhu, et al., 2016). De entrada, los macrófagos tumorales secretan elevadas cantidades de Ccl17 y Ccl22 que, a través del receptor

CCR4, reclutan linfocitos Treg al microambiente tumoral. Estos últimos se encargan de generar un ambiente inmunosupresor que favorece el desarrollo tumoral (revisado en Tanchot et al., 2013). Experimentos *in vivo* demuestran que la reducción de Ccl22 en el microambiente tumoral previene la migración de Tregs hacia el tumor y reducen el crecimiento tumoral (Anz et al., 2015; Myers et al., 2017). Además, la presencia de estas quimiocinas en el tumor puede tener otras implicaciones. Experimentos realizados en ratones atímicos, que carecen de linfocitos T, demostraron que la sobre-expresión de CCR4 en las células tumorales MDA-MB-231 exacerba el desarrollo de tumores de mama al igual que la metástasis de estos tumores hacia el pulmón (Yuet al., 2012). Estos experimentos sugieren que Ccl17 y Ccl22 podrían actuar directamente sobre las propias células tumorales. En este sentido, la activación del eje Ccl22-CCR4 en la célula tumoral, promueve la migración e invasión de células de cáncer de próstata (Maolake, et al., 2017). Por lo tanto, para saber si los cambios de concentración de quimiocinas observados en nuestro modelo tienen un efecto directo o indirecto sobre el desarrollo del tumor, serán necesarios experimentos para evaluar el reclutamiento de Tregs y la activación de linfocitos T citotóxicos en el tumor así como la actividad migratoria de las propias células tumorales.

Los subtipos de macrófagos analizados en este estudio son fenotípicamente distintos, siendo los MHCII^{Low} TAM más cercanos modelos de macrófagos con activación alternativa (fenotipo comúnmente asociado a los TAM en general) y los MHCII^{High} TAM más próximos a macrófagos con fenotipo pro-inflamatorio (Movahedi et al., 2010). Mientras que la activación alternativa de los macrófagos está típicamente dirigida por IL-4, se ha demostrado que GM-CSF se encarga de afinar el fenotipo característico de

los MHCII^{High} TAM, siendo responsable de la inducción de Ccl17 en estas células (Van Overmeire et al., 2016).

Utilizando macrófagos derivados de médula ósea, hemos demostrado que los LXR tienen la capacidad de reprimir la expresión de Ccl17 y Ccl22 tanto en respuesta a IL-4, como en respuesta a GM-CSF. La búsqueda del mecanismo subyacente, nos ha permitido constatar que las vías de señalización activadas por GM-CSF ó IL-4 convergen en la inducción de la expresión del factor de transcripción IRF4. Además la inducción de Ccl17 y Ccl22 por GM-CSF ó IL-4 depende de la actividad de este factor de transcripción ya que en macrófagos deficientes en IRF4 observamos una pérdida total de la inducción de las quimiocinas en cuestión. Nuestros resultados están en consonancia con un estudio reciente en el que se demostró que la inducción de Ccl17 por GM-CSF depende de la expresión de IRF4 (Achuthan et al., 2016). Curiosamente, en nuestro modelo, la actividad de IRF4 no es necesaria para la inducción de una batería de genes asociados a la adquisición de un fenotipo de activación alternativa por parte de los macrófagos, en particular *Ym1*, *Arg1*, *Mrc1* y *Mgl1*. De forma interesante, la estimulación con el agonista de LXR reprime significativamente la inducción de IRF4 en respuesta a GM-CSF ó IL-4.

Mediante análisis de los datos de ChiPseq publicados por otros autores (Ciofani et al., 2012), hemos localizado una región de reclutamiento de IRF4 en la cercanía de las regiones codificantes para Ccl17 y Ccl22. El análisis de la actividad enhancer de esta región, nos ha permitido constatar que se trata de una región funcional específicamente inducida por IRF4. Además, los agonistas de LXR reprimen la actividad de esta región, efecto que se pierde cuando IRF4 se encuentra sobreexpresado de forma constitutiva en los macrófagos. Estas observaciones sugieren que la reducción de la expresión de

IRF4 mediada por LXR sería suficiente para reducir la actividad de dicho enhancer. Finalmente, la activación de LXR también reprime la expresión de *Irf4* en los macrófagos tumorales.

De forma conjunta, los datos presentados en este trabajo sugieren que la activación de la vía LXR ejerce efectos represores sobre la producción de quimiocinas importantes en el microambiente tumoral a través de un mecanismo indirecto que implica la inhibición de la expresión del factor de transcripción IRF4. Futuros estudios deberán ser dirigidos a evaluar si estos efectos se traducen en un impacto sobre la actividad del sistema inmunitario adaptativo contra las células tumorales y/o si tienen implicación directa sobre la migración de las propias células tumorales.

Otra cuestión que nos queda abierta es la de identificar si algún factor de transcripción actúa como co-activador en la regulación de *Ccl17* y *Ccl22* mediada por IRF4. Hasta la fecha hemos podido evaluar la inducción de estas quimiocinas en macrófagos deficientes en *JunB* y *JunD*, factores de transcripción que han sido descritos anteriormente como co-activadores en la regulación de la transcripción de genes diana de IRF4 (P. Li et al., 2012). Sin embargo, nuestros datos revelan que la deficiencia de estos genes no afecta la inducción de las quimiocinas objeto de estudio. No podemos descartar, no obstante, que otros factores de transcripción (por ejemplo *BATF*, *KLF4* o *STAT3*) cooperen con IRF4 en la regulación de esta vía.

Conclusiones

1. La activación de LXR inhibe la proliferación de las líneas celulares BM-1833 y LM2-4175, interfiriendo sobre la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. A pesar de que el agonista de LXR inhibe la expresión de SKP2, los niveles de p27 no se ven afectados.
2. La activación de los LXR reprime la expresión del gen PMEPA1 en las líneas celulares BM-1833 y LM2-4175, efecto que se correlaciona con un aumento de la expresión del inhibidor p21 a nivel de mRNA.
3. La activación de los LXR ejercen un impacto represor moderado sobre la expresión de un subconjunto de genes asociados al perfil metastático hacia pulmón en la línea celular LM2-4175.
4. El agonista de LXR T1317 inhibe el crecimiento tumoral de la línea 3LLR *in vivo*. La expresión de LXR en el microambiente tumoral es necesaria para estos efectos.
5. Los LXR reducen la concentración de Ccl17 en el microambiente tumoral. Estos efectos se correlacionan con una represión de la expresión de Ccl17 a nivel de mRNA en los macrófagos asociados a tumor.
6. La inducción por IL-4 y GM-CSF de la expresión de Ccl17 y Ccl22 en macrófagos depende de la inducción del factor de transcripción IRF4.
7. JunB y JunD no intervienen como co-reguladores en la regulación de la expresión de Ccl17 y Ccl22 por IRF4.

8. Los LXR reprimen la inducción por IL-4 y GM-CSF de la expresión de Ccl17 y Ccl22 en macrófagos a través de la represión de la expresión de Irf4. También reprimen la expresión de Irf4 en los macrófagos asociados a tumor.

Bibliografía

- A-Gonzalez, N., Bensinger, S. J., Hong, C., Becciro, S., Bradley, M. N., Zelcer, N., ... Castrillo, A. (2009). Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity*, *31*(2), 245–58.
<http://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.018>
- Achuthan, A., Cook, A. D., Lee, M. C., Saleh, R., Khiew, H. W., Chang, M. W. N., ... Hamilton, J. A. (2016). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces CCL17 production via IRF4 to mediate inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, *126*(9), 3453–3466.
<http://doi.org/10.1172/JCI87828>
- Alberts, B., Alexander, J., Julian, L., David, M., Martin, R., Roberts, K., & Peter, W. (2014). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- Ali, S., Niesor, E. J., Bentzen, C. L., & Coombes, R. C. (2004). The Nuclear Oxysterol Receptor LXR α Is Expressed in the Normal Human Breast and in Breast Cancer, *21*(2), 123–131.
- Annunziato, F., Romagnani, C., & Romagnani, S. (2015). The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *135*(3), 626–635. JOUR.
<http://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.001>
- Anthonisen, E. H., Berven, L., Holm, S., Nygård, M., Nebb, H. I., & Grønning-Wang, L. M. (2010). Nuclear receptor liver X receptor is O-GlcNAc-modified in response to glucose. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(3), 1607–1615. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.082685>
- Anz, D., Rapp, M., Eiber, S., Koelzer, V. H., Thaler, R., Haubner, S., ... Bourquin, C. (2015). Suppression of Intratumoral CCL22 by Type I Interferon Inhibits Migration of Regulatory T Cells and Blocks Cancer Progression. *Cancer Research*, 4483–4494. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3499>

- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., ... Consortium, G. O. (2000). Gene Ontology: Tool for The Unification of Biology. *Nature Genetics*, 25(1), 25–29. <http://doi.org/10.1038/75556>
- Auer, H., Newsom, D. L., Nowak, N. J., McHugh, K. M., Singh, S., Yu, C.-Y., ... Kornacker, K. (2007). Gene-resolution analysis of DNA copy number variation using oligonucleotide expression microarrays. *BMC Genomics*, 8(1), 111. JOUR. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-8-111>
- Badalà, F., Nouri-mahdavi, K., & Raoof, D. A. (2013). On the Origin of Cancer Metastasis. *Computer*, 144(5), 724–732. <http://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Bai, X., Jing, L., Li, Y., Li, Y., Luo, S., Wang, S., ... Diao, A. (2014). TMEPAI inhibits TGF- β signaling by promoting lysosome degradation of TGF- β receptor and contributes to lung cancer development. *Cellular Signalling*, 26(9), 2030–2039. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.06.001>
- Baldan, A., Bojanic, D. D., & Edwards, P. A. (2008). The ABCs of sterol transport. *The Journal of Lipid Research*, 50(Supplement), S80–S85. <http://doi.org/10.1194/jlr.R800044-JLR200>
- Barba, I., Chavarria, L., Ruiz-Meana, M., Mirabet, M., Agulló, E., & Garcia-Dorado, D. (2009). Liver X Receptor Agonists Suppress Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Inhibit Neointima Formation in Balloon-Injured Rat Carotid Arteries. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 6), 1331–1341. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.163311>
- Becher, B., Tugues, S., & Greter, M. (2016). GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity*, 45(5), 963–973. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.026>
- Bensinger, S. J., Bradley, M. N., Joseph, S. B., Zelcer, N., Janssen, E. M., Hausner, M. A., ... Tontonoz, P. (2008). LXR Signaling Couples Sterol Metabolism to Proliferation in the Acquired Immune Response. *Cell*,

- 134(1), 97–111. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.052>
- Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, 11(10), 889–896. <http://doi.org/10.1038/ni.1937>
- Blaschke, F., Takata, Y., Caglayan, E., Collins, A., Tontonoz, P., Hsueh, W. A., & Tangirala, R. K. (2006). A nuclear receptor corepressor-dependent pathway mediates suppression of cytokine-induced C-reactive protein gene expression by liver X receptor. *Circulation Research*, 99(12). <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000252878.34269.06>
- Bos, P. D., Zhang, X. H.-F., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R. R., Nguyen, D. X., ... Massagué, J. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*, 459(7249), 1005–9. <http://doi.org/10.1038/nature08021>
- Brass, A. L., Kehrl, E., Eisenbeis, C. F., Storb, U., & Singh, H. (1996). Pip, a lymphoid-restricted IRF, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1. *Genes and Development*, 10(18), 2335–2347. <http://doi.org/10.1101/gad.10.18.2335>
- Brunschwig, E. B., Wilson, K., Mack, D., Cancer, M. C., Dawson, D., Lawrence, E., ... Markowitz, S. (2003). PMEPA1 , a Transforming Growth Factor- β -induced Marker of Terminal Colonocyte Differentiation Whose Expression Is Maintained in Primary and Metastatic Colon Cancer PMEPA1 , a Transforming Growth Factor- β -induced Marker of Terminal Colonocyte Different. *Cancer Research*, 1568–1575.
- Burris, T. P., Solt, L. A., Wang, Y., Crumbley, C., Banerjee, S., Griffett, K., ... Kojetin, D. J. (2013). Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacological Reviews*, 65(2), 710–778.

- <http://doi.org/10.1124/pr.112.006833>
- Campbell, M. J., Tonlaar, N. Y., Garwood, E. R., Huo, D., Moore, D. H., Khramtsov, A. I., ... Esserman, L. J. (2011). Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. *Breast Cancer Research and Treatment*, *128*(3), 703–711. <http://doi.org/10.1007/s10549-010-1154-y>
- Carosella, E. D., Favier, B., Rouas-freiss, N., Moreau, P., Lemaoult, J., & Bm, I. (2017). Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule, *111*(10), 4862–4871. <http://doi.org/10.1182/blood-2007-12-127662>.
- Carrano, a C., Eytan, E., Hershko, A., & Pagano, M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nature Cell Biology*, *1*(4), 193–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559916>
- Casazza, A., Laoui, D., Wenes, M., Rizzolio, S., Bassani, N., Mambretti, M., ... Mazzone, M. (2013). Impeding Macrophage Entry into Hypoxic Tumor Areas by Sema3A/Nrp1 Signaling Blockade Inhibits Angiogenesis and Restores Antitumor Immunity. *Cancer Cell*, *24*(6), 695–709. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.11.007>
- Cha, J. Y., & Repa, J. J. (2007). The Liver X Receptor (LXR) and hepatic lipogenesis: The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(1), 743–751. <http://doi.org/10.1074/jbc.M605023200>
- Chen, J Don; Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, *377*, 454–457.
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*, *39*(1), 1–10. JOUR. <http://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>

- Chen, M., Bradley, M. N., Beaven, S. W., & Tontonoz, P. (2006). Phosphorylation of the liver X receptors. *FEBS Letters*, *580*(20), 4835–4841. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.074>
- Chuu, C.-P., Kokontis, J. M., Hiipakka, R. A., & Liao, S. (2007). Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. *Journal of Biomedical Science*, *14*(5), 543–553. JOUR. <http://doi.org/10.1007/s11373-007-9160-8>
- Chuu, C.-P., & Lin, H.-P. (2010). Antiproliferative effect of LXR agonists T0901317 and 22(R)-hydroxycholesterol on multiple human cancer cell lines. *Anticancer Research*, *30*, 3643–3648.
- Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., MacE, K., Pauli, F., ... Littman, D. R. (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell*, *151*(2), 289–303. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.016>
- Collins, J. L., Fivush, A. M., Watson, M. A., Galardi, C. M., Lewis, M. C., Moore, L. B., ... Willson, T. M. (2002). Identification of a Nonsteroidal Liver X Receptor Agonist through Parallel Array Synthesis of Tertiary Amines. *Journal of Medicinal Chemistry*, *45*(10), 1963–1966. JOUR. <http://doi.org/10.1021/jm0255116>
- Coussens, L. M., Zitvogel, L., & Palucka, A. K. (2013). Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6117), 286–91. <http://doi.org/10.1126/science.1232227>
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., ... Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, *10*(9), 942–949. <http://doi.org/10.1038/nm1093>
- Dahlberg, C. I. M., Sarhan, D., Chrobok, M., Duru, A. D., & Alici, E. (2015). Natural killer cell-based therapies targeting cancer: Possible strategies to gain and sustain anti-tumor activity. *Frontiers in Immunology*, *6*(NOV).

- <http://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00605>
- Darnell, J. E. (1997). STATs and Gene Regulation. *Science*, 277(5332), 1630–1635. JOUR. Retrieved from <http://www.jstor.org.sire.ub.edu/stable/2894134>
- DeBose-Boyd, R. A., Ou, J., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2001). Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1477–82. <http://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1477>
- Delphin, S., & Stavnezer, J. (1995). Regulation of Antibody Class Switching to IgE: Characterization of an IL-4-Responsive Region in the Immunoglobulin Heavy-Chain Germline ϵ Promoter. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 764(1), 123–135. JOUR. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb55815.x>
- Deng, L., Zhang, H., Luan, Y., Zhang, J., Xing, Q., Dong, S., ... Wang, S. (2010). Accumulation of Foxp3⁺ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 16(16), 4105–4112. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1073>
- Doan, T. B., Graham, J. D., & Clarke, C. L. (2017). Emerging functional roles of nuclear receptors in breast cancer. *Journal of Molecular Endocrinology*, 58, 169–190. <http://doi.org/10.1530/JME-16-0082>
- Dong, Y., Gao, G., Fan, H., Li, S., Li, X., & Liu, W. (2015). Activation of the liver X receptor by agonist TO901317 improves hepatic insulin resistance via suppressing reactive oxygen species and JNK pathway. *PLoS ONE*, 10(4), 1–20. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0124778>
- Edwards, P. A., Kennedy, M. A., & Mak, P. A. (2002). LXRs; Oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid

homeostasis. *Vascular Pharmacology*, 38(4), 249–256.

[http://doi.org/10.1016/S1537-1891\(02\)00175-1](http://doi.org/10.1016/S1537-1891(02)00175-1)

El Chartouni, C., Schwarzfischer, L., & Rehli, M. (2010). Interleukin-4 induced interferon regulatory factor (Irf) 4 participates in the regulation of alternative macrophage priming. *Immunobiology*, 215(9–10), 821–5.

<http://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.031>

Esashi, E., Wang, Y. H., Perng, O., Qin, X. F., Liu, Y. J., & Watowich, S. S. (2008). The Signal Transducer STAT5 Inhibits Plasmacytoid Dendritic Cell Development by Suppressing Transcription Factor IRF8. *Immunity*, 28(4), 509–520. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.013>

Fernandes, J. V., Cobucci, R. N. O., Jatob??, C. A. N., de Medeiros Fernandes, T. A. A., de Azevedo, J. W. V., & de Ara??jo, J. M. G. (2015). The Role of the Mediators of Inflammation in Cancer Development. *Pathology and Oncology Research*, 21(3), 527–534.

<http://doi.org/10.1007/s12253-015-9913-z>

Fukuchi, J., Kokontis, J. M., Hiipakka, R. A., Chuu, C., & Liao, S. (2004). Antiproliferative Effect of Liver X Receptor Agonists on LNCaP Human Prostate Cancer Cells, 7686–7689.

Ghisletti, S., Huang, W., Jepsen, K., Benner, C., Hardiman, G., Rosenfeld, M. G., & Glass, C. K. (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. <http://doi.org/10.1101/gad.1773109>

Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M.-E., Willson, T. M., ... Glass, C. K. (2007). Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPAR γ . *Molecular Cell*, 25(1), 57–70.

<http://doi.org/10.3816/CLM.2009.n.003.Novel>

- Giannini, G., Ambrosini, M. I., Di Marcotullio, L., Cerignoli, F., Zani, M., MacKay, A. R., ... Gulino, A. (2003). EGF- and Cell-Cycle-Regulated STAG1/PMEPA1/ERG1.2 Belongs to a Conserved Gene Family and Is Overexpressed and Amplified in Breast and Ovarian Cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 38(4), 188–200. <http://doi.org/10.1002/mc.10162>
- Glass, C. K., & Ogawa, S. (2006). Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 6(January), 44–55. <http://doi.org/10.1038/nri1748>
- Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2000). receptors The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & Development*, 121–141. <http://doi.org/10.1101/gad.14.2.121>
- Gocheva, V., Wang, H. W., Gadea, B. B., Shree, T., Hunter, K. E., Garfall, A. L., ... Joyce, J. A. (2010). IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes and Development*, 24(3), 241–255. <http://doi.org/10.1101/gad.1874010>
- Gupta, B. S., Jiang, M., Anthony, A., & Pernis, A. B. (1999). Lineage-specific Modulation of Interleukin 4 Signaling by Interferon Regulatory Factor 4. *J. Exp. Med.*, 190(12), 1837–1848.
- Hamon, Y., Broccardo, C., Chambenoit, O., Luciani, M. F., Toti, F., Chaslin, S., ... Chimini, G. (2000). ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nature Cell Biology*, 2(7), 399–406. <http://doi.org/10.1038/35017029>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hercus, T., & Thomas, D. (2009). The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its

role in disease. *Blood*, 114(August), 1289–1298.

<http://doi.org/10.1182/blood-2008-12-164004>.

Heuff, G., Oldenburg, H. S. A., Boutkan, H., Visser, J. J., Beelen, R. H. J., Van Rooijen, N., ... Meyer, S. (1993). Enhanced tumour growth in the rat liver after selective elimination of Kupffer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 37(2), 125–130. article.

<http://doi.org/10.1007/BF01517045>

Hoberg, J. E., Yeung, F., & Mayo, M. W. (2004). {SMRT} derepression by the {IkappaB} kinase alpha: a prerequisite to {NF-kappaB} transcription and survival. *Mol. Cell*, 16(2), 245–255.

<http://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.010>

Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., ... Rosenfeld, M. G. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 377(6548), 397–404. JOUR. Retrieved from

<http://dx.doi.org/10.1038/377397a0>

Huang, D. W., Lempicki, R. a, & Sherman, B. T. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44–57.

<http://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>

Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 37(1), 1–13. JOUR. Retrieved from

<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn923>

Ikushima, H., Negishi, H., & Taniguchi, T. (2013). The IRF Family Transcription Factors at the Interface of Innate and Adaptive Immune Responses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, LXXVIII.

<http://doi.org/10.1101/sqb.2013.78.020321>

- Ishida, T., & Ueda, R. (2006). CCR4 as a novel molecular target for immunotherapy of cancer. *Cancer Science*, *97*(11), 1139–1146.
<http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00307.x>
- Ito, A., Hong, C., Rong, X., Zhu, X., Tarling, E. J., Hedde, P. N., ... Tontonoz, P. (2015). LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *eLife*, *4*(JULY 2015), 1–23.
<http://doi.org/10.7554/eLife.08009>
- Jakobsson, T., Treuter, E., Gustafsson, J. Å., & Steffensen, K. R. (2012). Liver X receptor biology and pharmacology: New pathways, challenges and opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences*, *33*(7), 394–404.
<http://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.013>
- Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R., & Mangelsdorf, D. J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR[alpha]. *Nature*, *383*(6602), 728–731. JOUR. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/383728a0>
- Joseph, S. B., Bradley, M. N., Castrillo, A., Bruhn, K. W., Mak, P. A., Pei, L., ... Tontonoz, P. (2004). LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell*, *119*(2), 299–309. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.032>
- Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J., & Tontonoz, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nature Medicine*, *9*(1078–8956), 213–219.
<http://doi.org/10.1038/nm820>
- Joseph, S. B., Laffitte, B. A., Patel, P. H., Watson, M. A., Matsukuma, K. E., Walczak, R., ... Tontonoz, P. (2002). Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(13), 11019–11025.

<http://doi.org/10.1074/jbc.M111041200>

Joseph, S. B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M. a, Collins, A. R., Laffitte, B. a, ... Tontonoz, P. (2002). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(11), 7604–7609.

<http://doi.org/10.1073/pnas.112059299>

Kang, Y., Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Córdón-Cardo, C., ... Massagué, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, *3*(6), 537–49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842083>

Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., & Grusby, M. J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity*, *4*(3), 313–319. [http://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80439-2](http://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80439-2)

Kim, K. H., Yoon, J. M., Choi, a H., Kim, W. S., Lee, G. Y., & Kim, J. B. (2009). Liver X receptor ligands suppress ubiquitination and degradation of LXRalpha by displacing BARD1/BRCA1. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *23*(4), 466–474. <http://doi.org/10.1210/me.2008-0295>

Kurth, I. (2016). *Development of an LXR agonist as first in class therapy for treatment of metastatic melanoma*. New York, NY, United States.

Kwon, H., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Kim, H. P., Oh, J., Tunyaplin, C., ... Leonard, W. J. (2009). Analysis of Interleukin-21-Induced Prdm1 Gene Regulation Reveals Functional Cooperation of STAT3 and IRF4 Transcription Factors. *Immunity*, *31*(6), 941–952.

<http://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.10.008>

Laar, L. Van De, Coffey, P. J., & Woltman, A. M. (2012). Regulation of dendritic cell development by GM-CSF : molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Development*, *119*(15),

- 3383–3393. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-11-370130>.The
- Lacey, D. C., Achuthan, a, Fleetwood, a J., Dinh, H., Roiniotis, J., Scholz, G. M., ... Hamilton, J. a. (2012). Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol*, *188*(11), 5752–5765. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1103426>
- Laffitte, B. A., Chao, L. C., Li, J., Walczak, R., Hummasti, S., Joseph, S. B., ... Tontonoz, P. (2003). Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(9), 5419–5424. <http://doi.org/10.1073/pnas.0830671100>
- Laffitte, B. A., Joseph, S. B., Walczak, R., Pei, L., Wilpitz, D. C., Collins, J. O. N. L., & Tontonoz, P. (2001). Autoregulation of the Human Liver X Receptor α Promoter. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(22), 7558–7568. <http://doi.org/10.1128/MCB.21.22.7558>
- Laudet, V., & Gronemeyer, H. (2002). 1 - General organization of nuclear receptors BT - The Nuclear Receptor FactsBook. In *Factsbook* (pp. 3–21). CHAP, London: Academic Press. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012437735-6/50003-5>
- Lee, C. G., Kang, K. H., So, J. S., Kwon, H. K., Son, J. S., Song, M. K., ... Im, S. H. (2009). A distal cis-regulatory element, CNS-9, controls NFAT1 and IRF4-mediated IL-10 gene activation in T helper cells. *Molecular Immunology*, *46*(4), 613–621. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.037>
- Lehmann, J. M., Kliewer, S. a, Moore, L. B., Smith-Oliver, T. a, Oliver, B. B., Su, J. L., ... Willson, T. M. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(6), 3137–40. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013544>

- Lehtonen, A., Veckman, V., Nikula, T., Lahesmaa, R., Kinnunen, L., Matikainen, S., & Julkunen, I. (2005). Differential expression of IFN regulatory factor 4 gene in human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *175*(10), 6570–9. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6570>
- León, T. (2013). *Selective roles of the nuclear receptor LXR in the transcriptional control of classical and alternative macrophage activation*. University of Barcelona.
- Li, P., Spolski, R., Liao, W., Wang, L., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & Leonard, W. J. (2012). BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. *Nature*, *490*(7421), 543–6. <http://doi.org/10.1038/nature11530>
- Li, X., Zhang, S., Blander, G., Tse, J. G., Krieger, M., & Guarente, L. (2007). SIRT1 Deacetylates and Positively Regulates the Nuclear Receptor LXR. *Molecular Cell*, *28*(1), 91–106. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.032>
- Li, Z., Chen, L., & Qin, Z. (2009). Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, *6*(6), 415–22. <http://doi.org/10.1038/cmi.2009.53>
- Lin, C., & Gustafsson, J.-åke. (2015). Targeting liver X receptors in cancer therapeutics. *Nature Publishing Group*, *15*(4), 216–224. <http://doi.org/10.1038/nrc3912>
- Lin, E. Y., Nguyen, a V, Russell, R. G., & Pollard, J. W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *The Journal of Experimental Medicine*, *193*(6), 727–40. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193412&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Liu, G., & Abraham, E. (2013). Macrophage Polarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *93*, 170–177. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300068>
- Liu, R., Zhou, Z., Huang, J., & Chen, C. (2011). PMEPA1 promotes androgen receptor-negative prostate cell proliferation through suppressing the Smad3/4-c-Myc-p21Cip1 signaling pathway. *Journal of Pathology*, *223*(5), 683–694. <http://doi.org/10.1002/path.2834>
- Lohoff, M., Mittrucker, H. W., Pechtl, S., Bischof, S., Sommer, F., Kock, S., ... Mak, T. W. (2002). Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(18), 11808–11812. <http://doi.org/10.1073/pnas.182425099>
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, *454*(7203), 436–44. <http://doi.org/10.1038/nature07205>
- Mantovani, A., & Sica, A. (2010). Macrophages , innate immunity and cancer : balance , tolerance , and diversity. *Current Opinion in Immunology*, *22*(2), 231–237. <http://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.009>
- Maolake, A., Izumi, K., Shigehara, K., & Natsagdorj, A. (2017). Tumor-associated macrophages promote prostate migration through activation of the CCL22 – CCR4 axis cancer, *8*(6), 9739–9751.
- Martinez, F. O., Helming, L., & Gordon, S. (2009). Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annual Review of Immunology*, *27*(1), 451–483. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132532>
- Matalonga, J., Gllaria, E., Bresque, M., Escande, C., Carbó, J. M., Kiefer, K., ... Valledor, A. F. (2017). The Nuclear Receptor LXR Limits Bacterial Infection of Host Macrophages through a Mechanism that Impacts Cellular NAD Metabolism. *Cell Reports*, *18*(5), 1241–1255. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.007>

- Mayo, J. (1972). Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. *Cancer Chemotherapy Reports* 2, 3(1), 325–30.
- Menéndez-gutiérrez, M. P., Rószler, T., Fuentes, L., Núñez, V., Escolano, A., Redondo, J. M., ... Ricote, M. (2014). Retinoid X receptors orchestrate osteoclast differentiation and postnatal bone remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, 1–15. <http://doi.org/10.1172/JCI77186DS1>
- Menéndez-gutiérrez, M. P., Rószler, T., Fuentes, L., Núñez, V., Escolano, A., Redondo, J. M., ... Ricote, M. (2015). Retinoid X receptors orchestrate osteoclast differentiation and postnatal bone remodeling, *125*(2), 809–823. <http://doi.org/10.1172/JCI77186DS1>
- Menéndez-Gutiérrez, M. P., Rószler, T., Fuentes, L., Núñez, V., Escolano, A., Redondo, J. M., ... Ricote, M. (2015). Retinoid X receptors orchestrate osteoclast differentiation and postnatal bone remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(2), 809–823. JOUR. <http://doi.org/10.1172/JCI77186>
- Miloux, B., Laurent, P., Bonnin, O., Lupker, J., Caput, D., Vita, N., & Ferrara, P. (1997). Cloning of the human IL-13R α 1 chain and reconstitution with the IL-4R α of a functional IL-4/IL-13 receptor complex. *FEBS Letters*, *401*(2–3), 163–166. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01462-7](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01462-7)
- Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., ... Massagué, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, *436*(7050), 518–24. <http://doi.org/10.1038/nature03799>
- Minn, A. J., Kang, Y., Serganova, I., Gupta, G. P., Giri, D. D., Doubrovin, M., ... Massagué, J. (2005). Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors, *115*(1). <http://doi.org/10.1172/JCI200522320.44>
- Mizukami, Y., Kono, K., Kawaguchi, Y., Akaike, H., Kamimura, K., Sugai,

- H., & Fujii, H. (2008). CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3⁺ regulatory T cells in gastric cancer. *International Journal of Cancer*, *122*(10), 2286–2293. <http://doi.org/10.1002/ijc.23392>
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stangé, G., Van Bossche, J. Den, ... Van Ginderachter, J. A. (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Research*, *70*(14), 5728–5739. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4672>
- Muranski, P., Restifo, N. P., & Dc, W. (2013). Essentials of Th17 cell commitment and plasticity Review Article Essentials of Th17 cell commitment and plasticity, *121*(13), 2402–2414. <http://doi.org/10.1182/blood-2012-09-378653>
- Murata, T., Taguchi, J., & Puri, R. K. (1998). Interleukin-13 receptor alpha' but not alpha chain: a functional component of interleukin-4 receptors. *Blood*, *91*(10), 3884–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9573026>
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, *11*(11), 723–737. <http://doi.org/Doi 10.1038/Nri3073>
- Myers, L., Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., ... Zou, W. (2017). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival, (October 2004). <http://doi.org/10.1038/nm1093>
- Nelms, K., Keegan, a D., Zamorano, J., Ryan, J. J., & Paul, W. E. (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual*

Review of Immunology, 17, 701–38.

<http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.701>

Nelson, E. R., Wardell, S. E., Jasper, J. S., Park, S., Suchindran, S., Howe, M.

K., ... McDonnell, D. P. (2013). 27-Hydroxycholesterol Links Hypercholesterolemia and Breast Cancer Pathophysiology. *Science*, 342(6162), 1094–1098. <http://doi.org/10.1126/science.1241908>

Nguyen-Vu, T., Vedin, L.-L., Liu, K., Jonsson, P., Lin, J. Z., Candelaria, N.

R., ... Lin, C.-Y. (2013). Liver X receptor ligands disrupt breast cancer cell proliferation through an E2F-mediated mechanism. *Breast Cancer Research : BCR*, 15(3), R51. <http://doi.org/10.1186/bcr3443>

Nguyen, D. X., Bos, P. D., & Massagué, J. (2009). Metastasis: from

dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4), 274–84. <http://doi.org/10.1038/nrc2622>

Noy, R., & Pollard, J. W. (2014). Tumor-Associated Macrophages: From

Mechanisms to Therapy. *Immunity*, 41(1), 49–61.

<http://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>

Ogawa, S., Lozach, J., Jepsen, K., Sawka-Verhelle, D., Perissi, V., Sasik, R., ...

Glass, C. K. (2004). A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40), 14461–14466.

<http://doi.org/10.1073/pnas.0405786101>

Oishi, Y., Spann, N. J., Link, V. M., Muse, E. D., Strid, T., Edillor, C., ...

Glass, C. K. (2016). SREBP1 Contributes to Resolution of Pro-inflammatory TLR4 Signaling by Reprogramming Fatty Acid Metabolism. *Cell Metabolism*, 25(2), 412–427.

<http://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.009>

Owen, J., Punt, J., & Stranford, S. (2012). *Kuby Immunology* (7th ed.).

macmillian learning.

Pascual-García, M., Carbó, J. M., León, T., Matalonga, J., Out, R., Van Berkel, T., ... Valledor, A. F. (2011). Liver X receptors inhibit macrophage proliferation through downregulation of cyclins D1 and B1 and cyclin-dependent kinases 2 and 4. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *186*(8), 4656–67.

<http://doi.org/10.4049/jimmunol.1000585>

Pascual-García, M., Rué, L., León, T., Carbó, J. M., Matalonga, J., Auer, H., ... Valledor, A. F. (2013). Reciprocal negative cross-talk between liver X receptors (LXRs) and STAT1: effects on IFN- γ -induced inflammatory responses and LXR-dependent gene expression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *190*(12):65(12), 6520–32.

<http://doi.org/10.4049/jimmunol.1201393>

Pascual-García, M., & Valledor, A. F. (2012). Biological roles of liver X receptors in immune cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *60*(4), 235–49. <http://doi.org/10.1007/s00005-012-0179-9>

Pascual, G., Fong, A. L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A. C., Perissi, V., ... Glass, C. K. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . *Nature*, *437*(7059), 759–63. <http://doi.org/10.1038/nature03988>

Pencheva, N., Buss, C. G., Posada, J., Merghoub, T., & Tavazoie, S. F. (2014). Broad-Spectrum Therapeutic Suppression of Metastatic Melanoma through Nuclear Hormone Receptor Activation. *Cell*, *156*(5), 986–1001. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.038>

Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, *141*(1), 39–51.

<http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>

- Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S., & Golub, T. R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature Genetics*, *33*(1), 49–54. <http://doi.org/10.1038/ng1060>
- Reichel, M., Nelson, B. H., Greenberg, P. D., & Rothman, P. B. (1997). The IL-4 receptor alpha-chain cytoplasmic domain is sufficient for activation of JAK-1 and STAT6 and the induction of IL-4-specific gene expression. *The Journal of Immunology*, *158*(12), 5860 LP-5867. JOUR. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/158/12/5860.abstract>
- Rengarajan, J., Mowen, K. A., McBride, K. D., Smith, E. D., Singh, H., & Glimcher, L. H. (2002). Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *The Journal of Experimental Medicine*, *195*(8), 1003–1012. <http://doi.org/10.1084/jem.20011128>
- Repa, J. J., & Mangelsdorf, D. J. (2000). RXR Receptors in the RXR Regulation. *Receptor*.
- Repa, J. J., Turley, S. D., Lobaccaro, J. A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., ... Mangelsdorf, D. J. (2000). Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science (New York, N.Y.)*, *289*(5484), 1524–9. <http://doi.org/10.1126/science.289.5484.1524>
- Rosenbauer, F., Waring, J. F., Foerster, J., Wietstruk, M., Philipp, D., & Horak, I. (1999). Interferon consensus sequence binding protein and interferon regulatory factor-4/Pip form a complex that represses the expression of the interferon-stimulated gene-15 in macrophages. *Blood*, *94*(12), 4274–4281.
- Rough, J. J., Monroy, M. A., Yerrum, S., & Daly, J. M. (2010). Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells,

1–10.

- Ruffell, B., Affara, N. I., & Coussens, L. M. (2012). Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends in Immunology*, *33*(3), 119–126. <http://doi.org/10.1016/j.it.2011.12.001>
- Ryan, J. J., McReynolds, L. J., Keegan, A., Wang, L. H., Garfein, E., Rothman, P., ... Paul, W. E. (1996). Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor. *Immunity*, *4*(2), 123–132. [http://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80677-9](http://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80677-9)
- Sato, N., Sakamaki, K., Terada, N., Arai, K., & Miyajima, A. (1993). Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible for different signaling. *The EMBO Journal*, *12*(11), 4181–4189.
- Schmidt, A., Oberle, N., & Krammer, P. H. (2012). Molecular mechanisms of treg-mediated cell suppression. *Frontiers in Immunology*, *3*(MAR), 1–20. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00051>
- Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., ... Shan, B. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes and Development*, *14*(22), 2831–2838. <http://doi.org/10.1101/gad.850400>
- Scott, R. S., McMahon, E. J., Pop, S. M., Reap, E. a, Caricchio, R., Cohen, P. L., ... Matsushima, G. K. (2001). Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*, *411*(6834), 207–211. <http://doi.org/10.1038/35075603>
- Sebastián, C., Serra, M., Yeramian, A., Serrat, N., Lloberas, J., & Celada, A. (2008). Deacetylase activity is required for STAT5-dependent GM-CSF functional activity in macrophages and differentiation to dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(9), 5898–5906. <http://doi.org/180/9/5898> [pii]

- Shimoda, K., van Deursent, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., ... Ihle, J. N. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted State6 gene. *Nature*, *380*(6575), 630–633. JOUR. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/380630a0>
- Singha, P. K., Yeh, I.-T., Venkatachalam, M. A., & Saikumar, P. (2010). Transforming growth factor-beta (TGF-beta)-inducible gene TMEPAI converts TGF-beta from a tumor suppressor to a tumor promoter in breast cancer. *Cancer Research*, *70*(15), 6377–83. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1180>
- So, A. Y., Sookram, R., Chaudhuri, A. A., Minisandram, A., Cheng, D., Xie, C., ... Baltimore, D. (2017). Dual mechanisms by which miR-125b represses IRF4 to induce myeloid and B-cell leukemias, *124*(9), 1502–1513. <http://doi.org/10.1182/blood-2014-02-553842>.The
- Stephen Paget. (1889). Distribution of Secondary Growths in Cancer of the Breast. *Lancet*, *133*, 571–573.
- Su, S., Liu, Q., Chen, J., Chen, J., Chen, F., He, C., ... Song, E. (2014). A Positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. *Cancer Cell*, *25*(5), 605–620. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.03.021>
- Svensson, P.-A., Hägg, D. a, Jernås, M., Englund, M. C. O., Hultén, L. M., Ohlsson, B. G., ... Carlsson, L. M. S. (2004). Identification of genes predominantly expressed in human macrophages. *Atherosclerosis*, *177*(2), 287–90. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.07.031>
- Talukdar, S., & Hillgartner, F. B. (2006). The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase-alpha gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *Journal of Lipid Research*, *47*(11), 2451–2461. <http://doi.org/10.1194/jlr.M600276-JLR200>

- Tanchot, C., Terme, M., Pere, H., Tran, T., Benhamouda, N., Strioga, M., ... Tartour, E. (2013). Tumor-infiltrating regulatory T cells: Phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance. *Cancer Microenvironment*, 6(2), 147–157. <http://doi.org/10.1007/s12307-012-0122-y>
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., & Tanaka, N. (2001). Irf Family of Transcription Factors. *Annual Review of Immunology*. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.623>
- Thibault, M., Mamessier, E., Gertner-dardenne, J., & Pastor, S. (2012). PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation, 25(2), 129–137. <http://doi.org/10.1093/intimm/dxs098>
- Torra, I. P., Ismaili, N., Feig, J. E., Xu, C.-F. F., Cavaletto, C., Pancratov, R., ... Garabedian, M. J. (2008). Phosphorylation of liver X receptor alpha selectively regulates target gene expression in macrophages. *Molecular and Cellular Biology*, 28(8), 2626–2636. <http://doi.org/10.1128/MCB.01575-07>
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563–2582. JOUR. <http://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Valledor, A. F., Hsu, L., Ogawa, S., Sawka-Verhelle, D., Karin, M., & Glass, C. K. (2004). Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(51), 17813–17818. <http://doi.org/10.1073/pnas.0407749101>
- Van Overmeire, E., Stijlemans, B., Heymann, F., Keirsse, J., Morias, Y., Elkrim, Y., ... Laoui, D. (2016). M-CSF and GM-CSF receptor signaling

- differentially regulate monocyte maturation and macrophage polarization in the tumor microenvironment. *Cancer Research*, 76(1), 35–42. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0869>
- Varin, A., & Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. *Immunobiology*, 214(7), 630–641. <http://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.009>
- Vedin, L.-L., Lewandowski, S. a, Parini, P., Gustafsson, J.-A., & Steffensen, K. R. (2009). The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 30(4), 575–9. <http://doi.org/10.1093/carcin/bgp029>
- Velazquez, L., Fellous, M., Stark, G. R., & Pellegrini, S. (1992). A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell*, 70(2), 313–322. JOUR. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90105-L](http://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90105-L)
- Venkateswaran, A., Laffitte, B. A., Joseph, S. B., Mak, P. A., Wilpitz, D. C., Edwards, P. A., & Tontonoz, P. (2000). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Cell*, 97(22), 12097–12102.
- Venteclef, N., Jakobsson, T., Ehrlund, A., & Dandimopoulos, A. (2010). GPS2-dependent corepressor / SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRb in the hepatic acute phase response. *Genes & Development*, 381–395. <http://doi.org/10.1101/gad.545110>
- Villablanca, E. J., Raccosta, L., Zhou, D., Fontana, R., Maggioni, D., Negro, A., ... Russo, V. (2010). Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nature Medicine*, 16(1), 98–105. <http://doi.org/10.1038/nm.2074>
- Vo Nguyen, T. T., Watanabe, Y., Shiba, A., Noguchi, M., Itoh, S., & Kato, M. (2014). TMEPAI/PMPEA1 enhances tumorigenic activities in lung

- cancer cells. *Cancer Science*, 105(3), 334–341.
<http://doi.org/10.1111/cas.12355>
- Wagner, B. L., Valledor, A. F., Shao, G., Daige, C. L., Bischoff, E. D., Petrowski, M., ... Glass, C. K. (2003). Promoter-Specific Roles for Liver X Receptor / Corepressor Complexes in the Regulation of ABCA1 and SREBP1 Gene Expression. *Society*, 23(16), 5780–5789.
<http://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5780>
- Wang, Y., Kurdi-Haidar, B., & Oram, J. F. (2004). LXR-mediated activation of macrophage stearyl-CoA desaturase generates unsaturated fatty acids that destabilize ABCA1. *Journal of Lipid Research*, 45(5), 972–80.
<http://doi.org/10.1194/jlr.M400011-JLR200>
- Watzlawik, J., Skora, L., Frense, D., Griesinger, C., Zweckstetter, M., Schulz-Schaeffer, W. J., & Kramer, M. L. (2006). Prion protein helix1 promotes aggregation but is not converted into β -sheet. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 30242–30250. <http://doi.org/10.1074/jbc>.
- Weinberg, D. H. and R. A. (2000). the hallmarks of cancer. *Cell*, 60(3), 319–326. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>
- Whiteside, T. L. (2009). The role of regulatory T cells in cancer. *Immune Network*, 9(6), 209–35. <http://doi.org/10.4110/in.2009.9.6.209>
- Whitney, K. D., Watson, M. A., Goodwin, B., Galardi, C. M., Maglich, J. M., Wilson, J. G., ... Kliewer, S. A. (2001). Liver X Receptor (LXR) Regulation of the LXR?? Gene in Human Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 43509–43515.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M106155200>
- Wolf, A. M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E., & Grubeck-loebenstein, B. (2003). Increase of Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Cancer Patients Advances in Brief Increase of Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Cancer Patients 1, 9(February), 606–

612.

- Youlin, K., Li, Z., Weiyang, H., Jian, K., Siming, L., & Xin, G. (2017). Pathology – Research and Practice Liver X receptor activation inhibits PC-3 prostate cancer cells via the beta-catenin pathway. *Pathology -- Research and Practice*, 213(3), 267–270.
<http://doi.org/10.1016/j.prp.2016.04.013>
- Yu, J. L. Z. O. S. (2012). The chemokine receptor CCR4 promotes tumor growth and lung metastasis in breast cancer, 837–848.
<http://doi.org/10.1007/s10549-011-1502-6>
- Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., Tontonoz, P., & Mev, S. (2009). LXR Regulates Cholesterol Uptake Through Idol-Dependent Ubiquitination of the LDL Receptor. *Life Sciences*, 325(July), 100–104.
<http://doi.org/10.1126/science.1168974>
- Zhang, R., Liu, Z., Li, Y., & Wu, B. (2016). LXR agonist regulates the proliferation and apoptosis of human T-Cell acute lymphoblastic leukemia cells via the SOCS3 pathway. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 78, 180–185.
<http://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.007>
- Zhu, F., Li, X., Chen, S., Zeng, Q., & Zhao, Y. (2016). Tumor-associated macrophage or chemokine ligand CCL17 positively regulates the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma. *Medical Oncology*, 33(2), 1–12.
<http://doi.org/10.1007/s12032-016-0729-9>

Anexo

