

Los **Dres. José Federico Díaz González** y **Javier Rafael Castro Hernández**, coordinador y componente del Grupo de Investigación Inflamación y Regeneración Tisular, respectivamente, adscrito a la Titulación que aparece en el encabezamiento

CERTIFICAMOS

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado **Papel de los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos en la activación de macrófagos** ha sido realizado bajo nuestra supervisión por **D. Sergio Iván Santos Concepción**, matriculado en el Máster en Biomedicina, durante el curso académico **2019/2020**.
- Que una vez revisada la memoria final del TFM, damos nuestro consentimiento para ser presentado (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.

Para que conste, firmamos el presente certificado en La Laguna, a 22 de junio de 2020

Fdo: Dr. José Federico Díaz González

Fdo: Dr. Javier Rafael Castro Hernández

Escuela de Doctorado y Estudios de Posgrado. Edificio Central. Campus Central. 38071 La Laguna.
C/ Delgado Barreto S/N. Tfno. (00 34) 922 31 9000
<http://www.escuelas.ull.es/view/centros/escueladoctorado/Inicio>: master@ull.es

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

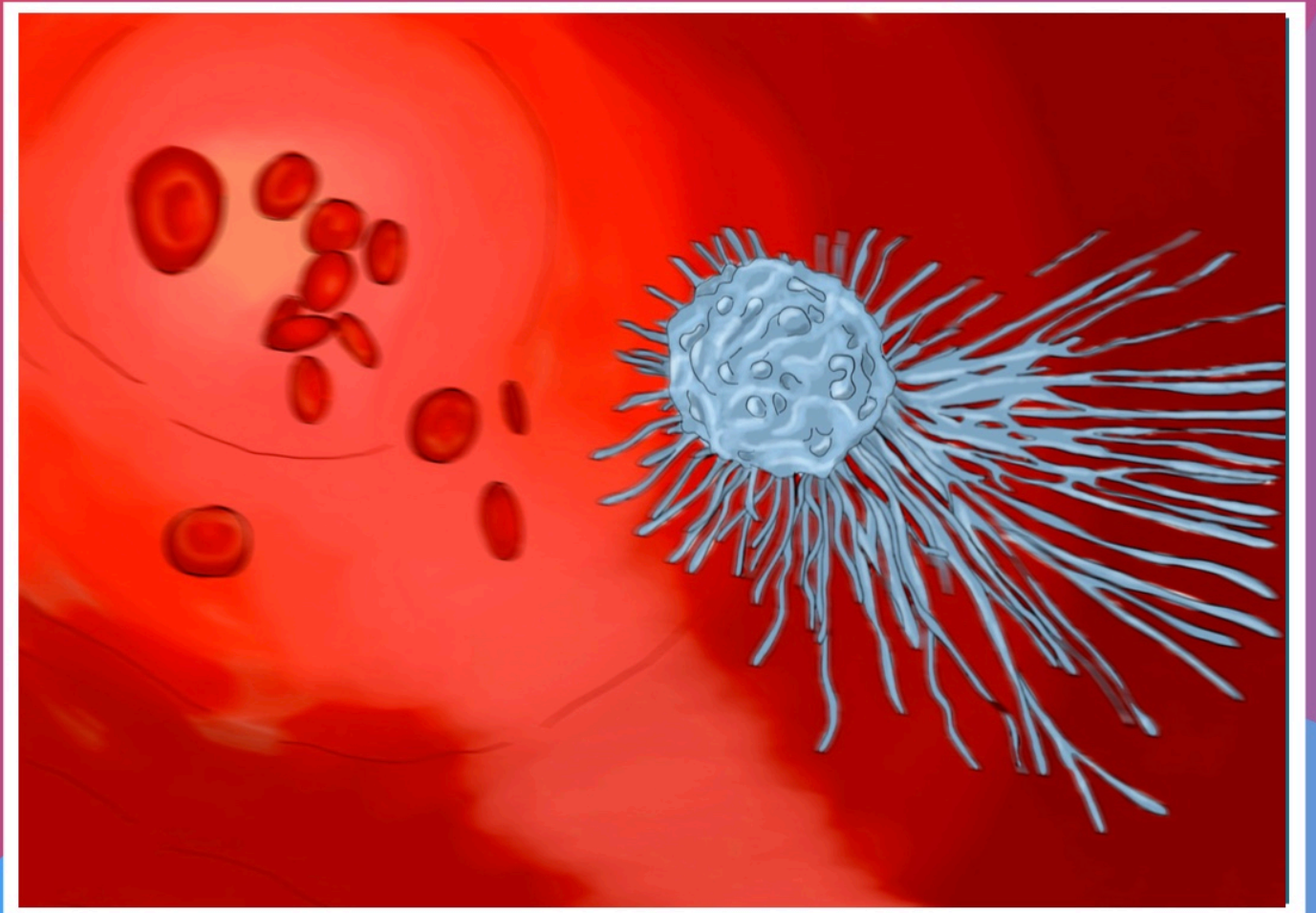
Identificador del documento: 2577082 Código de verificación: OrdntBMN

Firmado por: José Federico Díaz González
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 23/06/2020 15:01:16

Javier Rafael Castro Hernández
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

23/06/2020 15:02:22



Papel de los receptores α_2 adrenérgicos en la activación de macrófagos

Autor: Sergio Iván Santos Concepción

TUTORES:
JOSÉ FEDERICO DÍAZ GONZÁLEZ / JAVIER CASTRO HERNÁNDEZ

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
Los monocitos/macrófagos	5
Activación y polarización de macrófagos	5
Papel de la autofagia en la polarización de los macrófagos	6
Receptores $\alpha 2$ adrenérgicos	8
Papel de la noradrenalina en la regulación de la migración de monocitos	8
Infiltración de macrófagos en la enfermedad	9
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Animales y tratamientos	13
Cultivos celulares y tratamientos	13
Citometría de flujo	14
Inmunotransferencia (“ <i>western-blot</i> ”)	15
Análisis estadísticos	16
RESULTADOS	16
El tamaño de los macrófagos es un rasgo fenotípico de la activación de la clásica	16
Los cambios ambientales modulan la polarización de los macrófagos	18
La Guanfacina induce una depleción de macrófagos dependiente de $\alpha 2A$	22
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31

RESUMEN

Los monocitos son células clave en el inicio y el desarrollo de enfermedades de naturaleza inflamatoria. Estas patologías se caracterizan por una infiltración exacerbada de los monocitos en diferentes tejidos, promoviendo una inflamación sistémica que abarca desde situaciones agudas graves, como en la tormenta citoquímica del COVID-19, hasta crónicas de bajo grado, como ocurre en la obesidad. Utilizando una línea celular de monocitos/macrófagos *J774.2* hemos identificado subpoblaciones en cultivo que presentan diferencias fenotípicas tanto en su tamaño como en su estado de activación/polarización o en sus niveles de autofagia. En este trabajo describimos por primera vez la inducción de apoptosis de macrófagos mediada por agonistas $\alpha 2$ adrenérgicos, mecanismo que puede explicar datos previos de nuestro laboratorio, que demostraron que los agonistas de los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos reducen la presencia de leucocitos en el foco inflamatorio. Este trabajo sienta las bases de la eficacia de los agonistas $\alpha 2$ adrenérgicos como fármacos anti-inflamatorios, lo que permite plantear su traslación a la clínica en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de diferente naturaleza, pero con un factor común, la infiltración descontrolada de macrófagos.

Palabras clave: monocitos, macrófagos, autofagia, anti-inflamatorio, receptores $\alpha 2$ adrenérgicos.

ABSTRACT

Monocytes are key cells in the onset and development of inflammatory diseases. These pathologies are characterized by an exacerbated infiltration of monocytes in different tissues, promoting systemic inflammation that ranges from severe acute situations, such as the COVID-19 cytokine storm, to chronic low-grade events such as in obesity. Using a *J774.2* monocyte/macrophage cell line, we have identified cultured subpopulations that present phenotypic differences in both size, activation / polarization status, and autophagy levels. In this work, we describe for the first time the induction of macrophage apoptosis mediated by $\alpha 2$ adrenergic agonists, a mechanism that may explain previous data from our laboratory, which showed that $\alpha 2$ adrenergic agonists reduce the presence of leukocytes in the inflammatory focus. This work lays the foundations for the efficacy of $\alpha 2$ adrenergic agonists as anti-inflammatory drugs, for their transfer to the clinic in the treatment of diseases of different nature, but with a common factor, uncontrolled macrophage infiltration.

Key words: monocytes, macrophages, autophagy, anti-inflammatory, $\alpha 2$ adrenergic receptors.

INTRODUCCIÓN

Los monocitos/macrófagos

Los monocitos/macrófagos son las primeras células del sistema inmune que emergen durante el desarrollo embrionario. Los monocitos embrionarios se infiltran en los órganos en desarrollo, donde se diferencian en macrófagos residentes de tejidos (TRM) (1). Algunos TRMs provienen de células madre hematopoyéticas de la médula ósea del adulto y otros, en cambio, son derivados de precursores hematopoyéticos embrionarios tempranos (2). En la mayoría de los tejidos, incluidos el cerebro y el hígado, los TRMs son renovados *in situ* durante la vida adulta, con poca o ninguna contribución de los monocitos circulantes (2, 3), salvo en el intestino, donde hay una reposición constante por monocitos del torrente sanguíneo (4).

Aunque los macrófagos son bien conocidos por sus funciones inmunes, hay evidencias suficientes que revelan su importancia en la regulación del microambiente hematopoyético, en influenciar el metabolismo, mediar en la reparación tisular y supervisar la maduración del tejido embrionario (1). Para realizar estas funciones los monocitos deben 1) activarse/polarizarse y 2) migrar/infiltrarse en el tejido diana o foco inflamatorio.

Activación y polarización de macrófagos

El fenotipo de los macrófagos está altamente regulado por diferentes factores como moléculas señalizadoras (citoquinas, quimioquinas u hormonas), factores genéticos y epigenéticos, o el propio metabolismo del microbioma intestinal. En este sentido, los macrófagos se dividen en dos grandes subtipos dependiendo de su activación/polarización: los “clásicamente activados” o M1, implicados en el inicio y mantenimiento de la inflamación y, por tanto, considerados pro-inflamatorios; y por otro lado, los “alternativamente activados” o M2, que poseen propiedades anti-inflamatorias y están implicados en homeostasis tisular (5). La polarización a M1/M2 se refiere a fenotipos extremos que pueden ser simulados *in vitro* con la adición de varios estímulos como pueden ser el lipopolisacárido (LPS) o el interferón gamma (IFN- γ) para M1, o la interleuquina (IL)-4 para M2. Sin embargo, el escenario *in vivo* es más complejo y el espectro de polarización incluye diferentes subclases: M2a, M2b o M2c (6, 7) (ver

ilustración 1). Los M1 están caracterizados por la producción de elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias, la alta producción de especies reactivas de oxígeno y la promoción de respuestas Th1 (Linfocito T *helper 1*). En cambio, los M2 promueven las respuestas anti-inflamatorias Th2 (Linfocito T *helper 2*), la regeneración tisular, así como la angiogénesis.

Papel de la autofagia en la polarización de los macrófagos

La autofagia es un proceso catabólico que implica a los lisosomas, cuyo papel principal es la degradación de constituyentes celulares que no son esenciales o que se encuentran dañados, principalmente proteínas deletéreas y organelas defectuosas (8, 9). Este proceso lo llevan a cabo todas las células del organismo, ya sea de forma basal, o debido a condiciones de estrés celular, por ejemplo, debido a la limitación de nutrientes.

Se distinguen tres tipos de autofagia: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas, y microautofagia. La macroautofagia (a partir de ahora nos referiremos a ella como autofagia) es el tipo mejor estudiado. Este proceso se inicia con la formación de fagóforos, que son fragmentos de membrana cuyo origen no está del todo claro. Hamasaki y colaboradores sugieren que, al menos en mamíferos, su origen podría estar en las mitocondrias o en el retículo endoplásmico (10); otros autores indican que su origen podría estar en la membrana plasmática o en el aparato de Golgi (11, 12). A continuación, este fagóforo se expande a través de la adquisición de lípidos que al final se cierran hasta completar el proceso y generar el autofagosoma. Estos fagóforos se encargan de reclutar e incluir los componentes citoplasmáticos para su posterior degradación. Los autofagosomas se fusionarán más tarde con los lisosomas para dar lugar a los autolisosomas donde tendrá lugar la degradación de los componentes citoplasmáticos mediante enzimas degradativas.

La polarización de los macrófagos es mediada por rutas metabólicas intracelulares donde la diana para rapamicina en mamíferos (mTOR) juega un papel crucial (13, 14). mTOR es el interruptor del metabolismo celular. Su activación promueve el anabolismo celular, es decir, la proliferación y la síntesis proteica (muy necesaria en macrófagos cuando se polarizan a un estado pro-inflamatorio). Por el contrario, la inhibición de mTOR lleva a la activación de autofagia, que actúa como inmunosupresora (15). Un estudio encontró que una autofagia defectuosa promueve la polarización de los macrófagos a un estado

pro-inflamatorio por dos vías: inducción de activación a M1 e inhibición de la polarización a M2 (16). Algunos investigadores han mostrado que la activación crónica de mTOR en macrófagos promueve su hipertrofia y proliferación *in vivo* (17), indicando que una actividad excesiva de mTOR en macrófagos puede inducir su apoptosis (18). Además, el tratamiento con anticuerpos contra TNF (Factor de Necrosis Tumoral) activa un tipo de macrófagos con un fenotipo similar a los M2, con propiedades inmunosupresoras y regeneradoras, que tienen elevados niveles de autofagia (19). Por lo tanto, la modulación de la autofagia parece clave en la polarización de los macrófagos hacia M1 o M2, inhibiéndola o activándola, respectivamente.

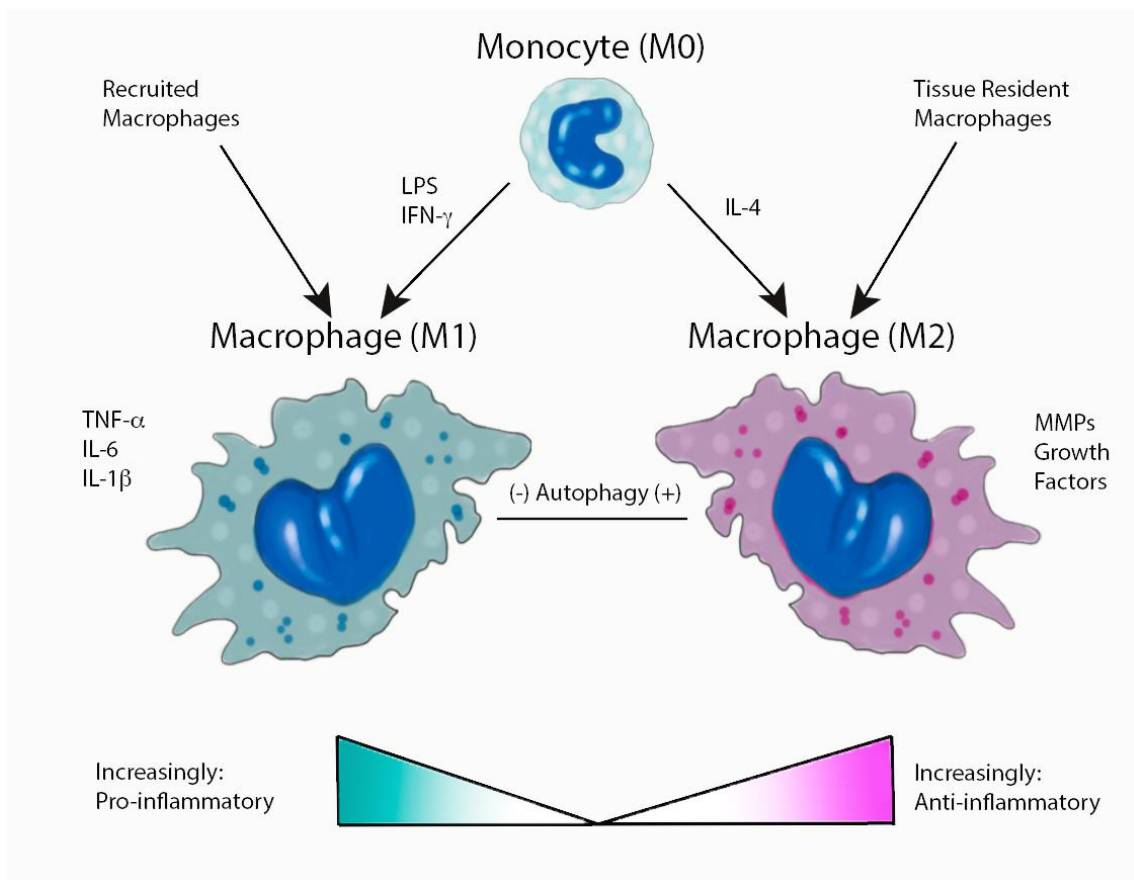


Ilustración 1: Polarización de macrófagos. Modificado de Stahl *et al.*, 2018 (20).

Receptores $\alpha 2$ adrenérgicos

Desde que se describió por primera vez la quinasa mTOR hace casi 30 años (21), muchos han sido los esfuerzos por desarrollar fármacos que modulen la autofagia y por estudiar sus mecanismos de acción. Existen fármacos que directamente inhiben el complejo mTOR e inducen autofagia, como es el caso de la rapamicina (22), o que la inhiben, como la hidroxiclороquina, que evita la fusión de los autofagosomas con los lisosomas (23). Ambos tipos de fármacos tienen una actividad sistémica, actuando en dianas que se expresan en todos los tipos celulares. Sin embargo, podemos modular la autofagia de forma específica empleando como dianas algunos receptores de membrana acoplados a proteína G, que solo se expresan en algunos tipos celulares, como ocurre con ciertos receptores adrenérgicos. Los receptores adrenérgicos, también denominados adrenoceptores, se expresan en la superficie de una amplia variedad de tipos celulares y son los responsables de mediar los efectos biológicos de las catecolaminas endógenas, adrenalina y noradrenalina. Hasta la fecha, nueve subtipos de estos receptores transmembrana unidos a proteínas G han sido clonados: $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$, $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ (24). Las funciones fisiológicas de muchos de estos receptores están aún en estudio y, a pesar de que la selectividad de los fármacos disponibles por los diferentes subtipos no ha sido bien establecida, una elevada variedad de agonistas α y β se han empleado en el tratamiento de diferentes enfermedades y situaciones patológicas en humanos: como descongestionantes ($\alpha 1$), antihipertensivos ($\alpha 2$), para el manejo del shock cardiogénico ($\beta 1$) o para el control del asma y EPOC ($\beta 2$). Sin embargo, la implicación de los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos en la respuesta inflamatoria y, en concreto su expresión en los macrófagos, está poco estudiada.

Papel de la noradrenalina en la regulación de la migración de monocitos

En condiciones bajas en nutrientes, o en las primeras horas de la mañana después del ayuno nocturno, cuando los procesos de autofagia están activados, el sistema nervioso simpático libera noradrenalina (25) para promover la lipólisis en el tejido adiposo para la producción de energía (26). Ocurre cuando los recuentos de monocitos circulantes alcanzan un mínimo, lo que sugiere que la noradrenalina actúa como mecanismo de control e induce la migración de monocitos al tejido adiposo (27). Algunos autores encontraron efectivamente que la noradrenalina podría inducir quimiotaxis de monocitos (28). Otros hallaron que la expresión del adrenoceptor $\alpha 2A$ en los monocitos actúa como

un receptor quimiotáctico, dirigiendo la migración de monocitos hacia la concentración más alta de noradrenalina *in vitro* (29). Esta migración de monocitos por la noradrenalina puede verse alterada en diferentes condiciones fisiológicas como el envejecimiento, donde los monocitos tienen una menor capacidad de responder a la noradrenalina, lo que posiblemente contribuye a la inmunosenescencia (30), o en la obesidad, donde los macrófagos se especializan para captar y degradar noradrenalina en el tejido adiposo, inhibiendo su acción lipolítica (31). Además de los macrófagos, en humanos, se ha descrito que el envejecimiento favorece la degradación de noradrenalina por adipocitos, lo que también genera una inhibición de la lipólisis (32), favoreciendo la acumulación de grasa y la infiltración de macrófagos (33, 34).

Infiltración de macrófagos en la enfermedad

La infiltración de macrófagos puede ocurrir de forma aguda en respuesta a un estímulo, como es el daño pulmonar o un síndrome de distrés respiratorio agudo, que ocurre en la infección por SARS-Cov-2. En este caso, los macrófagos alveolares migrados provienen de monocitos circulantes reclutados en el lumen alveolar en respuesta a un estímulo concreto (35). Pero también pueden infiltrarse por una condición crónica de abundancia en nutrientes, donde encontramos hiperglucemia en ayunas, como ocurre en la obesidad. En condiciones altas en nutrientes, debemos recordar que la autofagia permanece inhibida y se estimula la proliferación celular. La hiperglucemia induce un efecto activador en los macrófagos, exacerbando la migración de monocitos (36) y la producción de citoquinas pro-inflamatorias (37), incluso en ausencia de quimioquinas. Un estudio comprobó en ratones que, tras cuatro horas de ser alimentados después de un ayuno nocturno, recuperaron las cuentas de monocitos circulantes, mostrando que la salida de monocitos de la médula ósea es activada tras la ingesta de comida (38). Dicha ingesta eleva el número de macrófagos infiltrados en el peritoneo que secretan IL-1 β , una citoquina pro-inflamatoria que promueve la recaptación de glucosa en macrófagos (39). Además, el estado de hiperglucemia lleva asociado un estado de hiperinsulinemia, y se ha comprobado que la insulina atenúa la apoptosis de los macrófagos activados por LPS (40).

Como hemos expuesto anteriormente, el estado nutricional influye en la infiltración de macrófagos, aunque el mecanismo o mecanismos de infiltración no están bien estudiados. El grado de infiltración de macrófagos del tejido adiposo (ATM) se altera dinámicamente

en los estados delgado y obeso. En ratones obesos, los macrófagos constituyen cerca del 45-60% de todo el tejido adiposo, mientras que en ratones delgados solamente compromete el 10-15% (41). Infiltraciones de macrófagos se han descrito en diversas patologías asociadas al síndrome metabólico como son la diabetes tipo II (42), el hígado graso no alcohólico (43), la aterosclerosis (18) o el cáncer (44), y también en el envejecimiento (45). Pero también se ha descrito que la exposición a partículas de la contaminación ambiental potencia la infiltración y la secreción de citoquinas desde los macrófagos pulmonares (46) (**ver ilustración 2**).

Por tanto, entender la causa de esta infiltración puede ser crucial para restaurar el metabolismo y evitar la aparición de estas patologías, o incluso retrasar el envejecimiento (45). La hipertrofia de los macrófagos infiltrados ha sido asociada con un peor pronóstico de la enfermedad (18), y su depleción antes de la enfermedad ha significado menores niveles de citoquinas y mayor supervivencia (47).

En este estudio, utilizamos un ratón deficiente para el receptor $\alpha 2A$ adrenérgico y una línea celular murina de monocitos/macrófagos (J774.2) para identificar los cambios fenotípicos asociados con los macrófagos clásicamente activados y estudiar el papel del receptor $\alpha 2A$ adrenérgico en su polarización y migración. Nuestros resultados indican que la expresión del adrenoceptor $\alpha 2A$ es inducida tras la estimulación con LPS. Además, describimos cómo la Guanfacina, un agonista específico de $\alpha 2A$, disminuye la migración de monocitos y neutrófilos al foco inflamatorio en un modelo de inflamación *in vivo* (*air pouch*), e induce la depleción de macrófagos pro-inflamatorios *in vitro*. Nuestros datos sugieren que la Guanfacina puede ser una estrategia terapéutica efectiva para la obesidad y patologías asociadas al envejecimiento, donde la infiltración de macrófagos pro-inflamatorios es una característica principal.

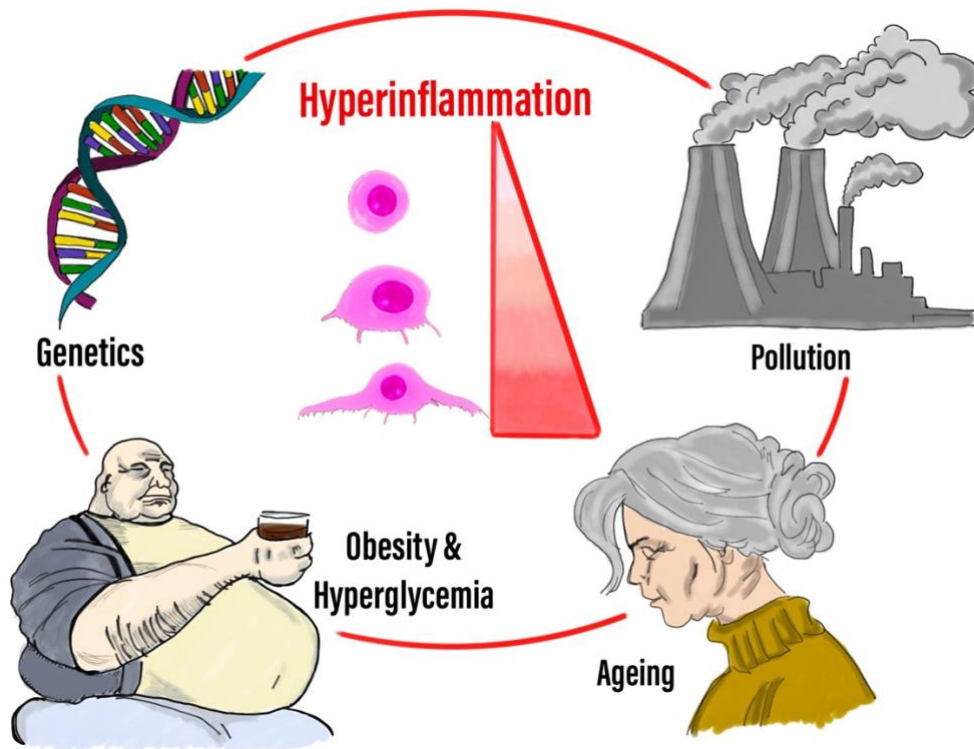


Ilustración 2: Factores de riesgo asociados a un estado de hiperinflamación y elevada infiltración de macrófagos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de este trabajo es que los agonistas $\alpha 2A$ adrenérgicos son efectivos para reducir la inflamación mediada por monocitos y mejorar el pronóstico en diferentes modelos de inflamación local.

Los objetivos concretos son:

- 1) Estudiar el fenotipo de los macrófagos activados a M1 *in vitro*.
- 2) Investigar si los agonistas $\alpha 2$ adrenérgicos inducen depleción de macrófagos en el foco inflamatorio.
- 3) Determinar si los agonistas $\alpha 2$ adrenérgicos son tratamientos efectivos en modelos de inflamación murinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y tratamientos

Los experimentos se realizaron utilizando animales deficientes para el receptor adrenérgico $\alpha 2A$ (Adra2a^{-/-}) (Charles River) y sus homólogos salvajes. Los animales seleccionados para el estudio eran de 3 meses de edad y sexo masculino, con un peso entre 25 y 30 g. Para estudiar la migración de monocitos y neutrófilos se utilizó el modelo de inflamación aguda de “*air pouch*”, utilizando zymosan A (Sigma-Aldrich) como quimioatrayente. El modelo de “*air pouch*” se estableció originalmente como una herramienta experimental para estudiar la inflamación en un tejido similar al sinovial (48). Seis días después de la inyección inicial de 5 ml de aire estéril en el dorso de los animales Adra2a^{-/-} y salvajes, se administró 0,5 ml de zymosan A, al 1% en las bolsas, para inducir una inflamación local. Los grupos de animales fueron tratados intramuscularmente con 1mg/kg de UK 14,304 (Sigma) o intraperitonealmente (i.p.) con Clorhidrato de Guanfacina (GF) (Sigma) o suero salino como control. Tras 4 h de la administración del zymosan A, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y el exudado de las bolsas de aire fue recogido mediante la instilación y recuperación de 5 ml de solución tampón fría con 3mM de EDTA. La concentración de monocitos y neutrófilos en el líquido exudado se evaluó por características de tamaño y complejidad en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences).

Cultivos celulares y tratamientos

En este estudio se ha empleado la línea celular J774.2 de monocitos/macrófagos, que proviene del subclonaje de la línea celular J774, procedente de un sarcoma de células reticulares de la cepa de ratón BALB/c (ATCC), que aislaron por primera vez Ralph, Prichard y Cohn (49). Se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomina (medio completo). Las células fueron cultivadas en placas de cultivo (Thermo Fisher Scientific) durante no más de 20 pases. Se sembraron 2×10^5 células por placa (Thermo Fisher Scientific). A continuación, tras lavar con solución de Hank's, se añadió medio completo y se procedió a los distintos tratamientos: Lipopolisacárido (LPS) [1 ng/ml] o UK14,304 [100 μ M] o Clorhidrato de Guanfacina [100 μ M] durante 24 horas (Sigma-Aldrich).

Para estudiar la acción de la glucosa en la polarización de macrófagos empleamos un medio sin glucosa, suplementado con D-Glucosa [5mM] (Glucosa baja) o D-Glucosa glucosa [20mM] (Glucosa alta) (Gibco).

Citometría de flujo

Los macrófagos *J774.2* crecidos en adherencia fueron utilizados en este estudio. Tras levantar las células con solución Tripsina-EDTA (GIBCO), ambas fueron lavadas a 1.500 rpm 4 °C durante 5 minutos y resuspendidas en 100 µl de FACS buffer (buffer salino PBS + 1% de suero fetal bovino, FBS).

A continuación, añadimos anticuerpo conjugado con ficoeritrina (PE) (Miltenyi Biotec; CD80) o con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (ImmunoTools; Cd11b). Los anticuerpos anti- Adra2b (Santa Cruz Biotechnology) o Adra2a (Santa Cruz Biotechnology) al no ser conjugados con fluoróforo, fueron incubados con un secundario Alexa Fluor 488 anti-cabra (Invitrogen), tras ser lavadas las células con FACS buffer. Incubamos en frío durante 30 minutos y luego añadimos 200 µl de FACS buffer y centrifugamos 5 minutos a 1.500 rpm, 4 °C. La expresión en superficie de las proteínas fue medida por citometría de flujo. El nivel de fluorescencia de los anticuerpos isotipo fue usada como control. Al menos 1×10^4 macrófagos de cada muestra fueron analizados usando un equipo Accuri C6 (BD Biosciences), y los datos fueron analizados con el programa BD Accuri C6.

Para evaluar la apoptosis/necrosis de las células *J774.2* empleamos el kit Annexin V-FITC (Sigma-Aldrich). El kit utiliza anexina V conjugada FITC para marcar los lugares de fosfatidilserina en la superficie de la membrana y, además, incluye yoduro de propidio (PI) para marcar el ADN en las células necróticas donde la membrana celular se ha visto totalmente comprometida. Esta combinación permite la diferenciación entre células apoptóticas tempranas, células necróticas y células viables. Para los experimentos se siguieron las instrucciones que recomienda el fabricante.

Para evaluar autofagia por citometría de flujo utilizamos el kit *Autophagy Assay* (Sigma-Aldrich), que utiliza un marcador de autofagosomas fluorescente. Para realizar el ensayo se siguieron las instrucciones que recomienda el fabricante.

Inmunotransferencia (“western-blot”)

La expresión de las diferentes proteínas se estudió mediante análisis por western-blot de extractos totales obtenidos a partir del lisado de células de macrófagos *J774.2*. Los extractos totales de proteína se obtuvieron usando el buffer de extracción proteica M-PER (Thermo Fisher Scientific) suplementado con un cóctel de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). La concentración de proteínas fue cuantificada usando el método del ácido bicinonínico y suero de albúmina bovina como estándar. Las muestras de proteínas para el análisis por western-blot en condiciones desnaturizantes se diluyeron al doble del volumen de la muestra, en una solución tampón de carga Laemmli (62.5 mM Tris-HCl, 20% de glicerol, 20% de dodecil sulfato sódico [SDS], 1.7% de β -mercaptoetanol y 0.05% de azul de bromofenol, pH 6.8) y se desnaturizaron durante 5 minutos a 95°C. Se cargaron 30 microgramos de proteína en cada pocillo. Posteriormente, se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida a concentraciones variables dependiendo del peso molecular de la proteína a analizar y se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con leche desnatada al 5% en TBS-T (250 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4, y 0.1% Tween 20) y se incubaron toda la noche a 4°C en solución bloqueante con el anticuerpo correspondiente (LC3B 1: 1000, Sigma; p62/SQSTM1 1: 1000, R&D Systems; α 2A 1: 1000, Santa Cruz Biotechnology; α 2B 1: 1000, Invitrogen; α 2C 1: 1000, Invitrogen). Tras varios lavados en TBS-T, las membranas fueron incubadas durante 1 hora con una IgG que reconoce el correspondiente anticuerpo primario conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson-ImmunoResearch; 1: 5000). Las bandas inmunorreactivas se visualizaron por amplificación quimioluminiscente (Immun-Star, Bio-Rad) usando un sistema de documentación de geles Chemi-Doc (Bio-Rad). Probamos diferentes cantidades de proteína, diluciones del anticuerpo y tiempos de exposición antes de establecer el rango de trabajo de cada anticuerpo. Después cada membrana de PVDF fue sometida a tratamiento de desenmascaramiento (62.5 mM Tris, pH 6.8, 2% SDS, 100 mM β -mercaptoetanol; 1 hora a temperatura ambiente) y procesada para el control de carga, α -tubulina (Sigma; 1: 5000). Las densidades de marcaje para cada anticuerpo fueron comparadas con su control de carga usando el programa de densitometría Image Lab 4.0.1 (Bio-Rad). Un rectángulo de tamaño y forma uniforme fue colocado sobre cada banda y los valores de densidad se calcularon sustrayendo del ruido de fondo de un rectángulo de dimensiones similares situado aproximadamente 2 mm por encima de cada banda.

Análisis estadístico

Se realizó ANOVA de una vía con test de Dunnett o t-student (Graphpad Prism, version 6, USA) considerando estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$ (*). Los resultados son representados como la media \pm la desviación estándar de la media (SEM).

RESULTADOS

El tamaño de los macrófagos es un rasgo fenotípico de la activación clásica

Se usó una línea celular murina de monocitos/macrófagos (*J774.2*) para estudiar el fenotipo de activación clásica. Anteriormente, Williams *et al.* describieron dos subpoblaciones diferentes en condiciones basales (ausencia de estimulación) en la línea celular *J774.1* (50). Definieron uno de estos subtipos como "redondo", y el otro como "extendido", que se correspondían, mediante el análisis del tamaño celular (FSC) en citometría, a células "más pequeñas" y células "más grandes", respectivamente. Confirmamos estas observaciones en *J774.2* por microscopía de contraste de fases (**Fig. 1A**, pequeña = **flecha roja**; grande = **flecha negra**). Además, encontramos un estado intermedio que definimos como medio (**Fig. 1A**, medio = **flecha azul**). Usando la citometría de flujo dividimos la población (P), definida por las células que expresan CD80 (CD80+) (**Fig. 1B**) en tres subpoblaciones diferentes según el tamaño (FSC) y la complejidad (dispersión lateral, SSC): pequeña (**S**), mediana (**M**) y grande (**L**) (**Fig. 1C**, **S** 28%, **M** 67%, **L** 5%). El nivel de expresión de CD80, evaluado por la intensidad media de fluorescencia (MFI) (un marcador de activación de M1) fue directamente proporcional al tamaño celular (**S** 1349 ± 31 MFI, **M** 2051 ± 98 MFI; y **L** 3879 ± 262 MFI, $p < 0.0001$; **Fig. 1D**). El ensayo de autofagia reveló un aumento en el número de autofagosomas en subpoblaciones medianas y grandes (**S** 1835 ± 185 MFI, **M** 2584 ± 238 MFI, **L** 3479 ± 181 MFI; $p < 0.01$; **Fig. 1E**). Finalmente, estudiamos si la activación de macrófagos se correlacionaba con un aumento de la apoptosis y la necrosis. Nuestros resultados indicaron que el porcentaje de células con un estado apoptótico o necrótico fue mayor entre las poblaciones medianas y grandes como se muestra en la **Fig. 1F** (**Viables**: **S** 61%, **M** 22%, **L** 0%; **Apoptosis temprana**: **S** 36%, **M** 64%, **L** 75%. **Apoptóticas tardías/Necróticas**: **S** 3%, **M** 13%, **L** 25%). En conjunto, estos resultados indican que el tamaño de los macrófagos en la línea celular *J774.1* es un rasgo fenotípico de la activación clásica.

FIGURA 1

Cell line from Monocyte/Macrophage J774.2

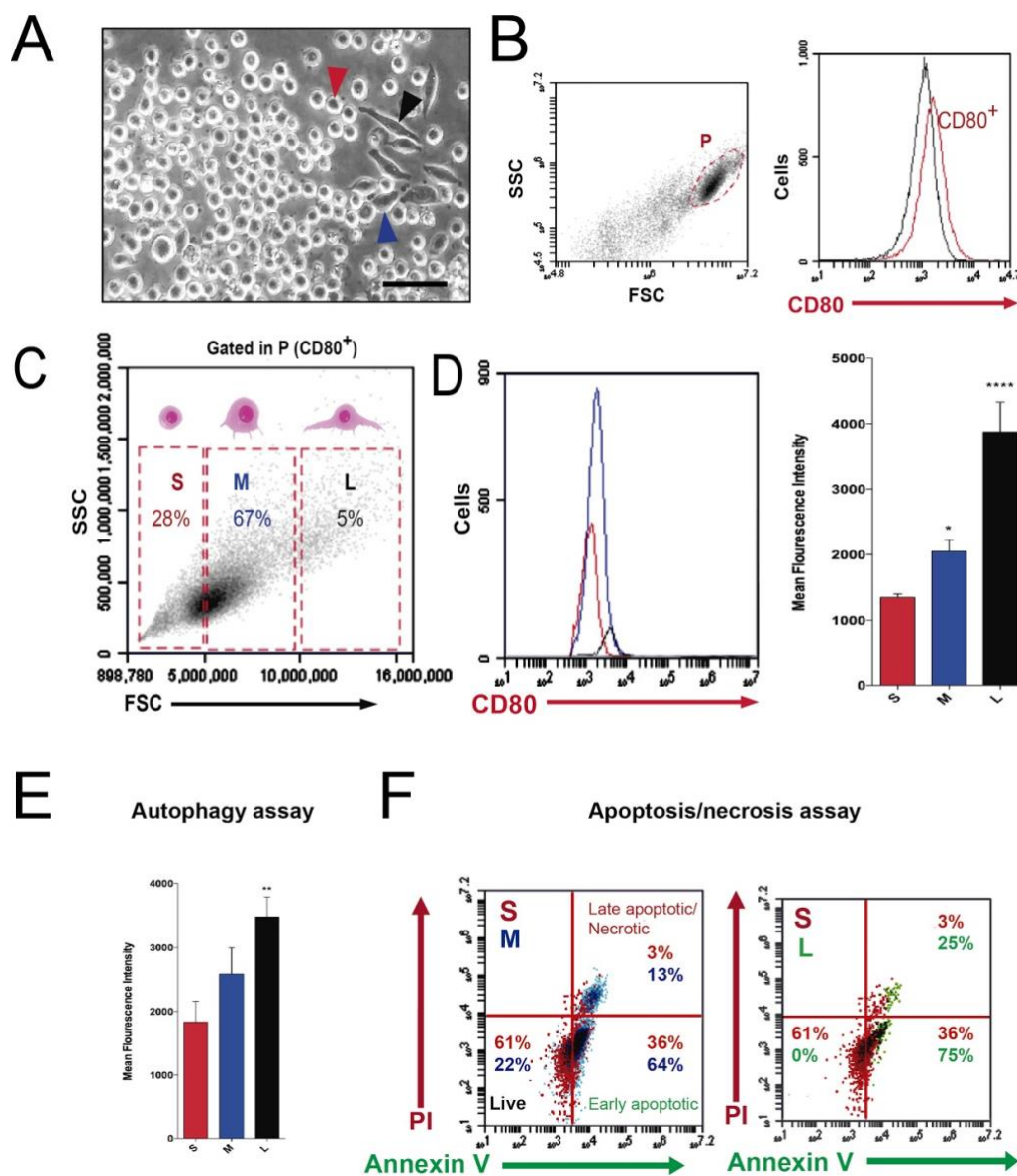


Fig. 1. Morfología, características de crecimiento, fenotipo y nivel basal de autofagia en la línea celular J774.2 (A) Fotografía obtenida por microscopía de contraste de fases de macrófagos J774.2 en cultivo, señalando las células redondeadas (flecha roja), células intermedias (flecha azul) y células alargadas (flecha negra). Barra de escala: 100 μ m. (B) Gráfico de citometría de flujo que muestra una selección de la población (P) -definida por las células CD80+. (C) Gráfico de citometría de flujo que muestra una división en tres subpoblaciones diferentes según el tamaño (FSC) y la complejidad (dispersión lateral, SSC): pequeña (S), mediana (M) y grande (L). (D) (izquierda) Gráfico de citometría de flujo que muestra el nivel de expresión de CD80+ (marcador de M1) en cada una de las

distintas subpoblaciones. (derecha) Gráfica de barras que muestra el nivel de expresión de CD80+ en células pequeñas (**S**), mediana (**M**) y grande (**L**). ANOVA, $p < 0.001$. * $p < 0.05$ y **** $p < 0.001$ respecto a la basal. (**E**) Gráfico de barras que muestra un ensayo de autofagia para las distintas subpoblaciones, empleando un marcador de autofagosomas fluorescente. ANOVA, $p < 0.01$ respecto a la basal. (**F**) Gráfico de citometría de flujo que muestra el porcentaje de células con un estado apoptótico/necrótico de las diversas subpoblaciones, clasificándose en viables (*live*), próximas a la apoptosis (*early apoptotic*) o apoptóticas/necróticas (*late apoptotic/necrotic*), empleando anexina V/yoduro de propidio.

Los cambios ambientales modulan la polarización de los macrófagos

La línea celular de macrófagos (*J774.2*) se cultivó en un medio suplementado con baja [5 mM] o alta concentración de glucosa [20 mM]. Encontramos que la concentración alta de glucosa induce un aumento en el número de células (el promedio de células en medio bajo en glucosa representa el 23.5% del total de las células en medio alto en glucosa; **S** 24,6%, $p < 0.01$; **M** 30,6%, $p < 0.01$; **L** 14,2%; $p < 0.01$; **Fig. 2A** y **2B**), duplicando el porcentaje de células grandes en medio con alta concentración de glucosa (**Fig. 2C**, *Low Glucose*: **S** 27%, **M** 70%, **L** 3%; *High Glucose*: **S** 33%, **M** 61%, **L** 6%). Estos datos sugieren un aumento de la proliferación celular mediado por la glucosa, sin afectar al promedio de tamaño de las células, expresado como FSC (**Fig. 2D**). Sin embargo, la mayor proliferación mostrada en las células suplementadas con alto contenido de glucosa se asoció con un mayor nivel de expresión de CD80, lo que sugiere una polarización hacia M1 (**Fig. 2E**, $p < 0.05$). Estos datos apoyan la hipótesis de que el nivel alto de glucosa puede inducir un estado pro-inflamatorio.

Para confirmar nuestra hipótesis de que los cambios fenotípicos de los macrófagos están asociados con una activación clásica, utilizamos lipopolisacárido (LPS), un conocido inductor de polarización a M1 (51). Como era de esperar, los macrófagos activados con LPS durante 24 h mostraron una morfología extendida (**Fig. 2F**) y un aumento promedio de tamaño (**Fig. 2G**, $p < 0.0001$). El porcentaje de células pequeñas pasó del 34% en controles (Ct) al 11% en células tratadas con LPS, y las células medianas aumentaron en un 24% (**Fig. 2H**; LPS: **S** 11%, **M** 85%, **L** 4%; Ct: **S** 34%, **M** 61%, **L** 5%). Estos cambios se asociaron con un aumento significativo de CD80 (**Fig. 2I**, $p < 0.0001$). Al haber observado que el LPS induce depleción de macrófagos (**Fig. 2K**), decidimos estudiar el

estado de apoptosis/necrosis en los macrófagos activados por LPS. Nuestros datos indican un mayor nivel de captación de yoduro de propidio (PI) en células activadas con LPS acompañado de un aumento de células necróticas (PI+) (**Fig. 2J**, Ct 6% frente a LPS 17.7%; $p < 0.0001$). Estos datos explican la depleción de macrófagos inducida por LPS expresado como porcentaje de células de control (**Fig. 2K**, $54,4 \pm 12,3\%$ de los controles; $p < 0.001$). Para investigar el mecanismo que impulsa la depleción, decidimos estudiar el estado de autofagia. La expresión de p62, una proteína que funciona como marcador de autofagia, ya que su degradación va por esta vía (52), aumentó en las células tratadas con LPS, lo que indica que la autofagia puede estar inhibida (**Fig. 2L**). Estos datos apoyan que un aumento del tamaño de los macrófagos es directamente proporcional a una elevada polarización a M1 y a un estado apoptótico/necrótico.

FIGURA 2

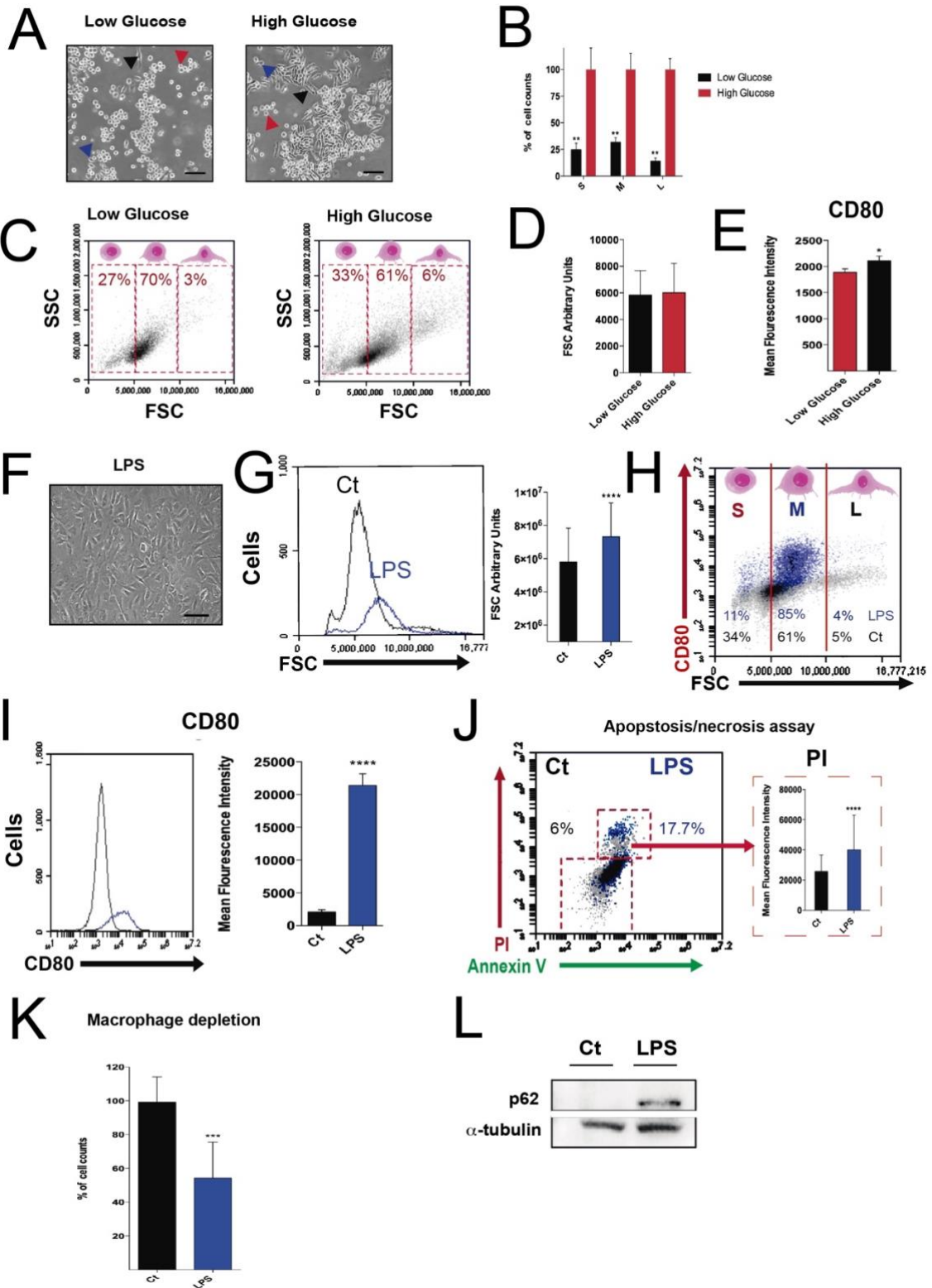


Fig. 2. Modulación de la polarización de macrófagos mediada por cambios ambientales (A) Fotografía obtenida por microscopía de contraste de fases de una línea celular de macrófagos (*J774.2*) cultivada en un medio suplementado con

baja concentración de glucosa [5 mM] o alta concentración de glucosa [20 mM]. Barra de escala: 100 μ m. **(B)** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de las diversas subpoblaciones celulares en medio de glucosa alta y glucosa baja. T de Student, $p < 0.01$. **(C)** Gráfico de citometría de flujo que muestra la clasificación por tamaño y complejidad de las diversas subpoblaciones según se encuentren en medio alto o bajo en glucosa. **(D)** Gráfica de barras que relaciona el tamaño promedio de las células, expresado como FSC, y el medio en el que crecieron, siendo alto o bajo en glucosa. **(E)** Gráfica de barras que relaciona el nivel de intensidad de fluorescencia de CD80+ (marcador de M1) y el medio, alto o bajo en glucosa. T de Student, $p < 0.05$. **(F)** Fotografía obtenida por microscopía de contraste de fases de macrófagos *J774.2* en cultivo activados con LPS durante 24 h. Barra de escala: 100 μ m. **(G)** (izquierda) Gráfico de citometría de flujo que muestra la relación entre el tamaño (FSC) y el número de células en células control y activadas con LPS. (derecha) Gráfica de barras que representa el tamaño de las células control y tratadas con LPS. T de Student, $p < 0.0001$. **(H)** Gráfico de citometría de flujo que muestra la clasificación por tamaño (FSC) y por intensidad de fluorescencia de CD80+ de células tratadas con LPS y células control (Ct). **(I)** (izquierda) Gráfico de citometría de flujo que muestra el nivel de expresión de CD80+ en células control y en células tratadas con LPS. (derecha) Gráfica de barras que muestra la intensidad de fluorescencia de CD80+ en células tratadas con LPS y en células control. t de Student, $p < 0.0001$. **(J)** Gráfico de citometría de flujo que muestra el estado de apoptosis / necrosis en macrófagos activados por LPS y en macrófagos control. **(K)** Gráfica de barras que muestra la depleción de macrófagos reflejado en porcentaje de células tratadas con LPS (54,35%) con respecto a las células control (100%). T de Student, $p < 0.001$. **(L)** Imagen de Western-Blot que muestra la expresión de p62 (marcador de autofagia) en *J744.2* basal y tras la aplicación de guanfacina (GF). Se usó α -tubulina como control de carga.

La Guanfacina induce una depleción de macrófagos dependiente de $\alpha 2A$

Nuestro estudio tenía como objetivo investigar el papel de los receptores adrenérgicos $\alpha 2$ en la respuesta innata mediada por los macrófagos. Los experimentos de inmunotransferencia mostraron que los macrófagos expresan a nivel basal los receptores adrenérgicos $\alpha 2B$ y $\alpha 2C$, pero $\alpha 2A$ no fue detectable en estas condiciones (**Fig. 3A**). Tras la activación con LPS, se indujo la expresión de $\alpha 2A$ (**Fig. 3B**, $p < 0.001$). El perfil inducible de expresión de $\alpha 2A$ nos llevó a pensar que la Guanfacina, un agonista específico de $\alpha 2A$, podría funcionar como una “bala mágica” para controlar la población de macrófagos. Las células tratadas con Guanfacina no aumentaron el tamaño promedio como sí lo hicieron con LPS (**Fig. 3C**). Sin embargo, la Guanfacina indujo una disminución aguda de los macrófagos, tal y como hizo LPS, y este efecto aumentó cuando ambos tratamientos se combinaron (**Fig. 3D**, Ct $99.3 \pm 4.1\%$ vs GF 60.9 ± 2.1 , $p < 0.01$; vs GF + LPS $20.6 \pm 1.6\%$; $p < 0.0001$). El estudio de la expresión de LC3-II y p62, dos marcadores de autofagia, muestra que la Guanfacina induce una inhibición de la autofagia (aumento de p62 y LC3-II) como el LPS, lo que puede explicar la apoptosis de los macrófagos (**Fig. 3E**). La diferencia entre LPS y Guanfacina es que LPS induce una mayor polarización a M1, que aumenta su estado apoptótico/necrótico, mientras que Guanfacina induce una depleción de macrófagos selectiva de las células activadas.

Estos resultados nos llevaron a estudiar la depleción inducida por Guanfacina en un modelo murino de inflamación aguda, para probar la efectividad *in vivo*. Estudiamos macrófagos y también neutrófilos, socios clave de los macrófagos en la respuesta inmune innata. Los neutrófilos se identificaron con CD11b⁺ y los macrófagos se identificaron con $\alpha 2B$ ⁺ y por tamaño (FSC), considerando un tamaño de $> 5 \times 10^6$ unidades arbitrarias para macrófagos activados (**Fig. 3F**). Resultados previos de nuestro laboratorio indican que el subtipo $\alpha 2B$ no se expresa en neutrófilos (53). El modelo de inflamación mediada por Zymosan “*air-pouch*” reveló que la Guanfacina induce una reducción en la infiltración de macrófagos (**Fig. 3G**, Wt Sham $36,30 \pm 7,2$ vs Wt +GF $3,95 \pm 1,34$, $p < 0,05$) y neutrófilos (**Fig. 3G**, Wt Sham $1.669 \pm 0,21$ vs Wt +GF $0.522 \pm 0,09$, $p < 0,001$; Wt Sham 1.669 vs Wt +UK14,304 $0.267 \pm 0,09$, $p < 0,001$). Esta reducción se evitó en ratones que carecen del receptor $\alpha 2A$, lo que confirma que Guanfacina induce una depleción de macrófagos dependiente de $\alpha 2A$ (**Fig. 3G**).

FIGURA 3

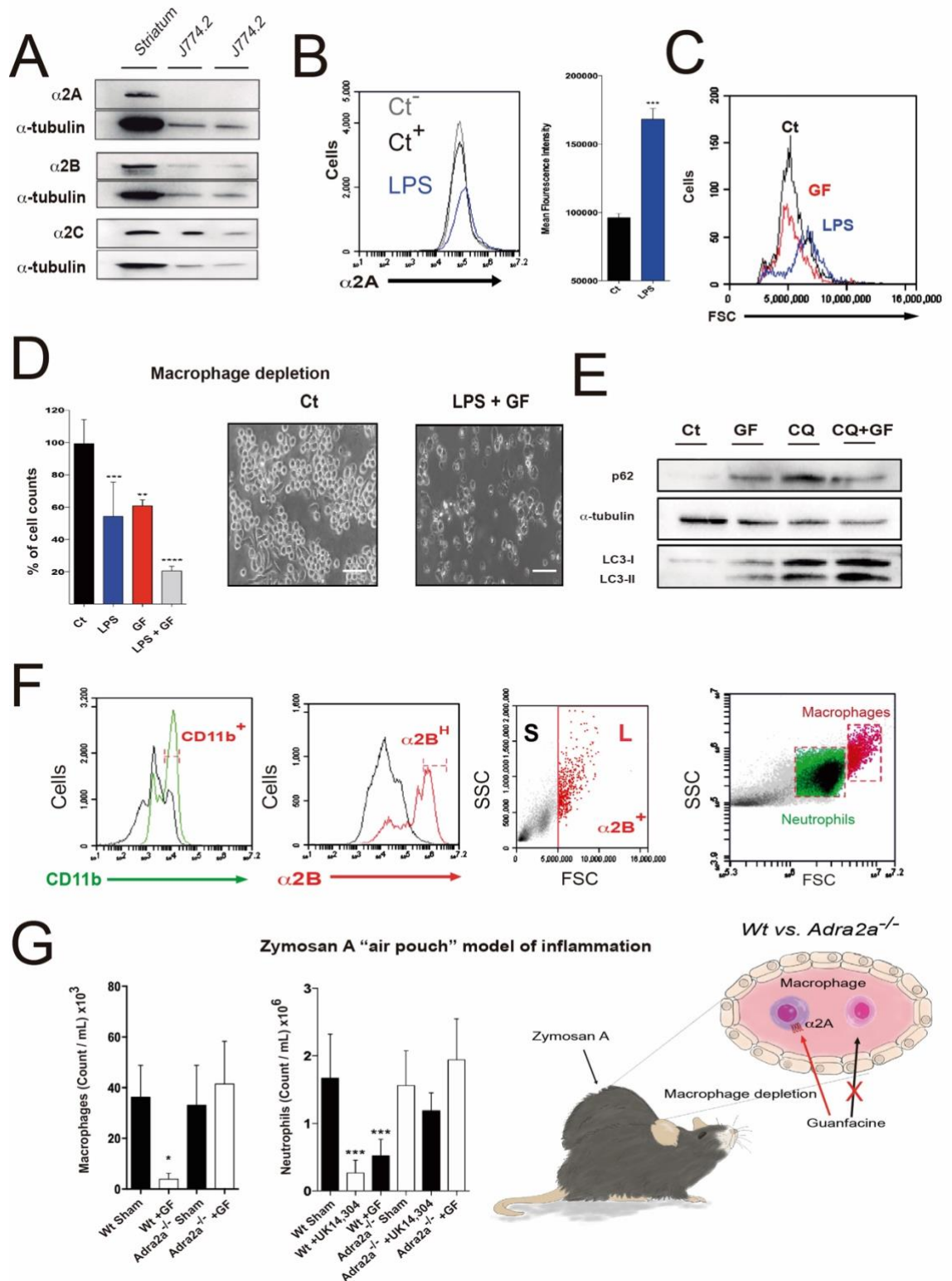


Fig. 3. Depleción de macrófagos dependiente de $\alpha 2A$ inducida por Guanfacina. A)

Imagen de Western-Blot que muestra la expresión basal de los receptores adrenérgicos $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ y $\alpha 2C$ en J774.2. Se empleó un extracto proteico de estriado de ratón (St) como

control positivo. Se usó α -tubulina como control de carga. **B)** (izquierda) Gráfico de citometría de flujo que muestra el nivel de expresión de α 2A tras la activación con LPS, por intensidad de fluorescencia. (derecha) Gráfica de barras que muestra el nivel de expresión de α 2A en células control y en células tratadas con LPS. T de Student, $p < 0.001$

C) Gráfico de citometría de flujo que muestra la clasificación por tamaño y por número de células control, tratadas con LPS y tratadas con Guanfacina (GF). **D)** (izquierda) La gráfica de barras muestra el porcentaje del número de células contadas control frente a tratadas con LPS, con Guanfacina y con una combinación de LPS + Guanfacina. ANOVA, $p < 0.0001$. (derecha) Fotografía obtenida por microscopía de contraste de fases de macrófagos *J774.2* en cultivo en condiciones basales y en tratados con LPS + Guanfacina. Barra de escala: 100 μ m. **E)** Imagen de Western-Blot que muestra la expresión de p62 y LC3B (marcadores de autofagia) en *J774.2* basal y tras la aplicación de Guanfacina (GF), cloroquina (CQ). Se usó α -tubulina como control de carga. Para el análisis de LC3B se calculó la ratio entre LC3-II y α -tubulina, y la ratio entre LC3-II y LC3-I. **F)** Gráficos de citometría de flujo que muestran el nivel de expresión de CD11b⁺ para identificar neutrófilos (izquierda), nivel de expresión de α 2B⁺ para identificar macrófagos (centro) e identificación por tamaño (FSC) y complejidad (SSC) (derecha).

G) Gráfica de barras que muestra el conteo de neutrófilos (expresados en cuentas por mL $\times 10^6$, Wt Sham 1,67 vs Wt+UK 14,304 0,268, Wt+GF 0,522. ANOVA, p valor < 0.0001) y macrófagos (expresados en cuentas por mL $\times 10^3$, Wt Sham 36,3 vs Wt + GF 3,95. ANOVA, p valor < 0.05) en el modelo de inflamación aguda por Zymosan A “air pouch”. Ilustración que muestra el mecanismo sugerido de acción de la Guanfacina en el modelo de inflamación “*air pouch*”, en ratones normales y en ratones que carecen del receptor α 2A.

DISCUSIÓN

Los macrófagos están presentes ejerciendo acciones efectoras en el tejido inflamado y/o dañado, tratándose, por tanto, de dianas potenciales para terapias dirigidas a controlar la inflamación (54) o, por ejemplo, prevenir el daño neuronal o promover la regeneración tisular (37). Se han descrito diversas condiciones fisiológicas donde los macrófagos inducen una inflamación sistémica subclínica. Todas las enfermedades relacionadas con el envejecimiento, o el envejecimiento en sí mismo, presentan infiltración de macrófagos en uno o varios tejidos (45, 55). Hay una infiltración importante de macrófagos en la obesidad (31) y la hiperglucemia (39, 56). Esta infiltración es la causa principal de esta inflamación también llamada de bajo grado (55). Estas condiciones son factores acumulables que predisponen a tener un peor pronóstico en enfermedades inflamatorias y contribuyen a reducir la esperanza de vida (45), esencialmente por un incremento del riesgo cardiovascular (57). Recientemente, varios estudios han establecido que la respuesta inflamatoria exacerbada impulsada por los macrófagos, especialmente en personas mayores, es una de las principales causas de gravedad y muerte en la COVID-19, un enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2 (35). La evidencia actual sugiere que los macrófagos pro-inflamatorios derivan principalmente de monocitos circulantes que se infiltran masivamente en los tejidos, en lugar de derivar de poblaciones de TRMs (58, 59). Sin embargo, las estrategias para inducir la depleción de estos macrófagos infiltrados, o para evitar su extravasación, son escasas, no selectivas y van acompañadas de efectos secundarios perjudiciales (60, 61). En este trabajo describimos, por primera vez, cómo la Guanfacina, un agonista α_2 adrenérgico específico del subtipo de receptor α_2A utilizado en clínica para el tratamiento del trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) (62), induce la depleción de macrófagos pro-inflamatorios por un mecanismo mediado por el receptor α_2 adrenérgico.

Para determinar si la Guanfacina era selectiva de los macrófagos pro-inflamatorios estudiamos el fenotipo de estos. Nuestros datos muestran que el fenotipo pro-inflamatorio de los macrófagos se caracteriza por un mayor tamaño, una mayor expresión de CD80, inhibición de la autofagia y un estado apoptótico/necrótico elevado. Es bien conocido que el fenotipo de los macrófagos está modulado por la forma de la célula (63). Nuestros resultados confirmaron resultados previos que encontraron una correlación entre el tamaño de los macrófagos y la polarización clásica (64). Recientemente se ha descrito

que los pacientes con COVID-19 grave presentan monocitos de mayor tamaño, que expresan marcadores de macrófagos, con un fenotipo pro-inflamatorio (65). Se han reportado otras condiciones fisiopatológicas, como la hiperglucemia, que aumentan la mortalidad en pacientes con una enfermedad inflamatoria (66). En este sentido, investigadores encontraron que la IL-1 β y la insulina aumentan la captación de glucosa por los macrófagos, y que la insulina refuerza el patrón pro-inflamatorio elevando la producción de especies reactivas de oxígeno y secreción de IL-1 β mediada por el inflammasoma NLRP3 (39). Nuestros resultados apuntan en la misma línea, mostrando que, en microambientes con concentraciones elevadas de glucosa, los macrófagos experimentan una activación pro-inflamatoria que promueve su proliferación, duplicando el porcentaje de los macrófagos de mayor tamaño (L), como otros han descrito previamente (36, 67).

El LPS ha sido ampliamente utilizado como modelo de activación pro-inflamatoria tanto *in vivo* como *in vitro*, por ello decidimos emplearlo para caracterizar el fenotipo de los macrófagos clásicamente activados. Previamente se ha descrito que la inhibición de la autofagia podría conducir a la apoptosis de macrófagos a través de p62 (68–70). Nuestros resultados muestran que bajo la activación pro-inflamatoria inducida por LPS, los macrófagos aumentaron la expresión de p62 y que esta expresión se relaciona con una mayor apoptosis y necrosis. Además, encontramos una correlación positiva entre el tamaño de los macrófagos y el aumento de marcador de autofagosomas en macrófagos *in vitro*. Estos resultados confirman que la activación clásica de macrófagos está asociada con una inhibición de la autofagia que lleva a apoptosis. Pero, además, como ya se describió para el hígado y la microglia hipotalámica (71, 72), el tratamiento con LPS indujo la expresión del receptor adrenérgico α 2A en los macrófagos tras su activación, lo que sugiere que el receptor adrenérgico α 2A tiene un papel clave en la respuesta innata impulsada por los macrófagos. Estos datos son importantes, porque evidencian que la Guanfacina no tiene un efecto significativo sobre la activación de monocitos y, preferiblemente, induce apoptosis en los macrófagos clásicamente activados que expresan α 2A. Esto lo confirmamos mediante el uso de ratones deficientes para este subtipo de receptor adrenérgico, donde la Guanfacina no tuvo efecto, lo que indica que la depleción de macrófagos que causa el descenso en la migración al foco inflamatorio está mediada por el receptor adrenérgico α 2A. En este sentido, se ha descrito que la hiperinflamación relacionada con la edad es mediada por el receptor adrenérgico α 2A (73).

Encontramos un efecto sinérgico en la inducción de apoptosis de los macrófagos cuando tratamos con una combinación de LPS y Guanfacina, pasando de un 54,4% (LPS solo), a un 20,6% de supervivencia cuando tratamos con los dos compuestos (LPS +GF). Nuestros datos indican que la activación clásica por LPS induce un aumento de la expresión del receptor adrenérgico $\alpha 2A$, es decir, aumenta el número de dianas celulares para la Guanfacina. En esta línea, investigadores han descrito un aumento de la producción de TNF- α en células de Kupffer tratadas con LPS. Lo interesante de su trabajo es que esta producción es mucho más elevada cuando combinan el tratamiento de LPS con noradrenalina, concluyendo que el aumento de la producción de TNF- α es mediada por el receptor $\alpha 2A$ adrenérgico (71). Dado que TNF- α es el principal inductor de apoptosis en macrófagos (74, 75), el aumento de su producción en presencia de Guanfacina podría llevar a una elevación aguda de esta citoquina pro-inflamatoria que promueva la rápida muerte celular programada de los macrófagos (74, 75), favoreciendo la resolución de la respuesta inflamatoria. El objetivo de futuros experimentos en nuestro laboratorio es estudiar los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en animales y células tratadas con Guanfacina para comprobar si la depleción de macrófagos es una terapia eficaz contra los síndromes de hiperinflamación o de tormenta de citoquinas inducidos por la respuesta exacerbada de los macrófagos.

Este trabajo abre las puertas a un nuevo abordaje terapéutico con el que controlar la población de macrófagos pro-inflamatorios en los tejidos que sufren su infiltración con el objetivo de reducir la inflamación sistémica crónica asociada, descrita en el síndrome metabólico, enfermedades inflamatorias y otras enfermedades asociadas al envejecimiento o psiquiátricas (**ver ilustración 3 y tabla 1**). La depleción de macrófagos mediada por $\alpha 2A$ será analizada por nuestro laboratorio en diferentes modelos de inflamación en ratón para comprobar su eficacia en la obesidad, la artritis reumatoide, el cáncer o la hiperinflamación asociada a la COVID-19.

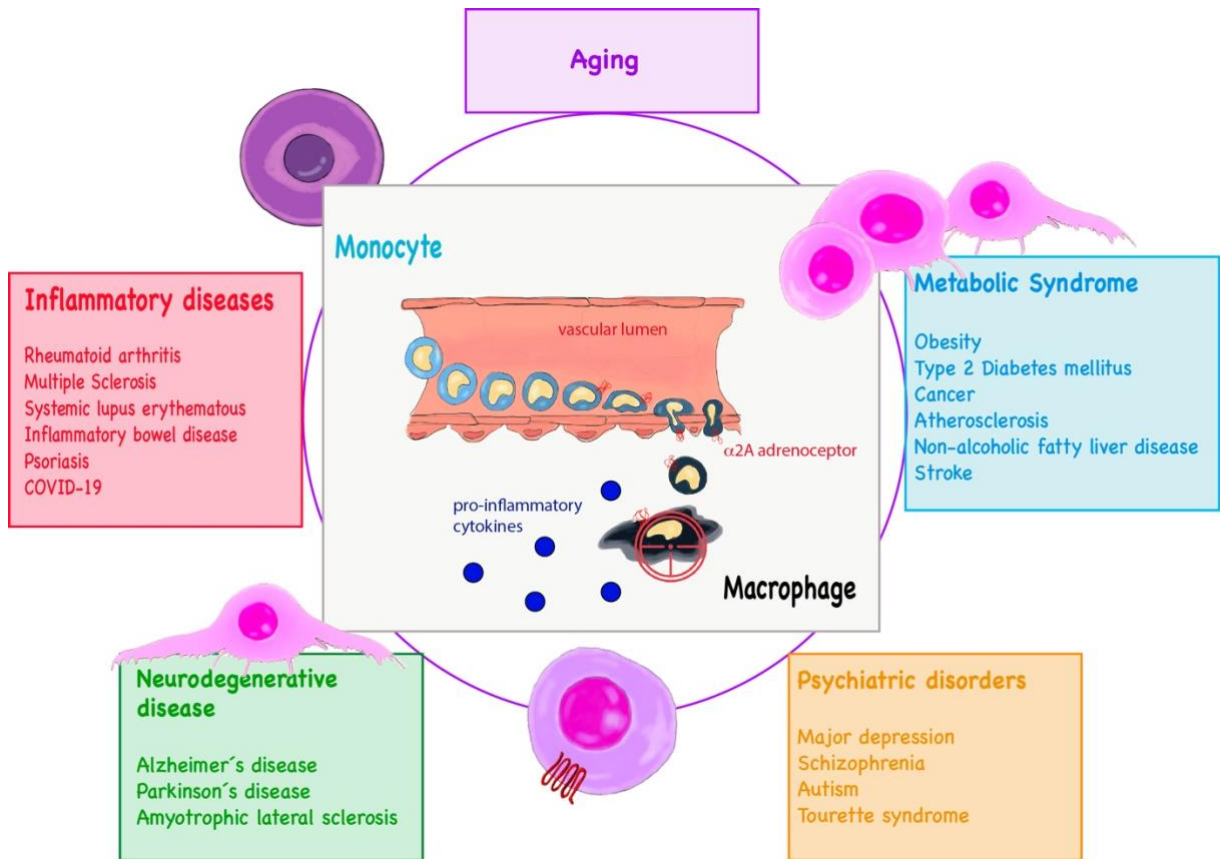


Ilustración 3: El receptor α_2A adrenérgico es una diana farmacológica potencial en diversas enfermedades donde la infiltración de monocitos y la proliferación de macrófagos pro-inflamatorios se ha descrito como disfuncional.

Tabla 1: Enfermedades donde la depleción de macrófagos pro-inflamatorios puede ser una diana farmacológica potencial.

Síndrome metabólico	Referencias
Obesidad	(31, 41, 76)
Diabetes mellitus tipo II	(77, 78)
Hipertensión	(79, 80)
Cáncer	(81, 82)
Aterosclerosis	(83, 84)
Hígado graso no alcohólico	(85)
Ictus	(86)

Enfermedades inflamatorias	Referencias
Artritis reumatoide	(87, 88)
Esclerosis múltiple	(89, 90)
Lupus eritematoso sistémico	(91, 92)
Enfermedad inflamatoria intestinal	(4)
Psoriasis	(93, 94)
COVID-19	(35, 95)

Enfermedades neurodegenerativas	Referencias
Enfermedad de Alzheimer	(96, 97)
Enfermedad de Parkinson	(98)
Esclerosis lateral amiotrófica	(99, 100)

Enfermedades psiquiátricas	Referencias
Depresión mayor	(101, 102)
Esquizofrenia	(102–104)
Autismo	(105–107)
Síndrome de Tourette	(108)

CONCLUSIONES

1. La activación de los macrófagos a M1 conlleva cambios fenotípicos caracterizados por un aumento de su tamaño, inhibición de autofagia y aumento de marcadores apoptótico/necróticos.
2. La concentración elevada de glucosa induce la proliferación y la polarización de macrófagos a M1 *in vitro*.
3. La activación de macrófagos por LPS induce la expresión del receptor $\alpha 2A$ adrenérgico *in vitro*.
4. La Guanfacina induce la depleción de macrófagos activados *in vitro*, inhibiendo autofagia.
5. La Guanfacina reduce la migración de monocitos en un modelo murino de inflamación aguda, por un mecanismo dependiente del receptor $\alpha 2A$ adrenérgico.

BIBLIOGRAFÍA

1. T. A. Wynn, A. Chawla, J. W. Pollard, Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* (2013), , doi:10.1038/nature12034.
2. F. Ginhoux, M. Guilliams, Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* (2016), , doi:10.1016/j.immuni.2016.02.024.
3. S. Yona, K. W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guilliams, A. Misharin, D. A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer, S. Jung, Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* (2013), doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001.
4. Y. R. Na, M. Stakenborg, S. H. Seok, G. Matteoli, Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* (2019), , doi:10.1038/s41575-019-0172-4.
5. P. J. Murray, J. E. Allen, S. K. Biswas, E. A. Fisher, D. W. Gilroy, S. Goerdts, S. Gordon, J. A. Hamilton, L. B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F. O. Martinez, J. L. Mege, D. M. Mosser, G. Natoli, J. P. Saeij, J. L. Schultze, K. A. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, J. A. vanGinderachter, S. N. Vogel, T. A. Wynn, Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* (2014), , doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008.
6. F. Porcheray, S. Viaud, A. C. Rimaniol, C. Léone, B. Samah, N. Dereuddre-Bosquet, D. Dormont, G. Gras, Macrophage activation switching: An asset for the resolution of inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* (2005), doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x.
7. J. Van den Bossche, L. A. O'Neill, D. Menon, Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? *Trends Immunol.* (2017), , doi:10.1016/j.it.2017.03.001.
8. Y. Chen, D. J. Klionsky, The regulation of autophagy - Unanswered questions. *J. Cell Sci.* (2011), , doi:10.1242/jcs.064576.
9. D. C. Rubinsztein, The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* (2006), , doi:10.1038/nature05291.
10. M. Hamasaki, N. Furuta, A. Matsuda, A. Nezu, A. Yamamoto, N. Fujita, H.

- Oomori, T. Noda, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, A. Amano, T. Yoshimori, Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* (2013), doi:10.1038/nature11910.
11. Y. Ohashi, S. Munro, Membrane delivery to the yeast autophagosome from the golgi-endosomal system. *Mol. Biol. Cell* (2010), doi:10.1091/mbc.E10-05-0457.
 12. B. Ravikumar, K. Moreau, L. Jahreiss, C. Puri, D. C. Rubinsztein, Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* (2010), doi:10.1038/ncb2078.
 13. V. Byles, A. J. Covarrubias, I. Ben-Sahra, D. W. Lamming, D. M. Sabatini, B. D. Manning, T. Horng, The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nat. Commun.* (2013), doi:10.1038/ncomms3834.
 14. E. Vergadi, E. Ieronymaki, K. Lyroni, K. Vaporidi, C. Tsatsanis, Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *J. Immunol.* (2017), doi:10.4049/jimmunol.1601515.
 15. R. A. Saxton, D. M. Sabatini, mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* (2017), , doi:10.1016/j.cell.2017.02.004.
 16. K. Liu, E. Zhao, G. Ilyas, G. Lalazar, Y. Lin, M. Haseeb, K. E. Tanaka, M. J. Czaja, Impaired macrophage autophagy increases the immune response in obese mice by promoting proinflammatory macrophage polarization. *Autophagy* (2015), doi:10.1080/15548627.2015.1009787.
 17. M. Linke, H. T. T. Pham, K. Katholnig, T. Schnöller, A. Miller, F. Demel, B. Schütz, M. Rosner, B. Kovacic, N. Sukhbaatar, B. Niederreiter, S. Blüml, P. Kuess, V. Sexl, M. Müller, M. Mikula, W. Weckwerth, A. Haschemi, M. Susani, M. Hengstschläger, M. J. Gambello, T. Weichhart, Chronic signaling via the metabolic checkpoint kinase mTORC1 induces macrophage granuloma formation and marks sarcoidosis progression. *Nat. Immunol.* (2017), doi:10.1038/ni.3655.
 18. X. Zhang, I. Sergin, T. D. Evans, S. J. Jeong, A. Rodriguez-Velez, D. Kapoor, S. Chen, E. Song, K. B. Holloway, J. R. Crowley, S. Epelman, C. C. Weihl, A. Diwan, D. Fan, B. Mittendorfer, N. O. Stitzel, J. D. Schilling, I. J. Lodhi, B. Razani, High-protein diets increase cardiovascular risk by activating macrophage mTOR to suppress mitophagy. *Nat. Metab.* (2020), doi:10.1038/s42255-019-

- 0162-4.
19. A. D. Levin, P. J. Koelink, F. M. Bloemendaal, A. C. W. Vos, G. R. D'Haens, G. R. Van Den Brink, M. E. Wildenberg, Autophagy contributes to the induction of anti-TNF induced macrophages. *J. Crohn's Colitis* (2016), doi:10.1093/ecco-jcc/jjv174.
 20. E. C. Stahl, M. J. Haschak, B. Popovic, B. N. Brown, Macrophages in the aging liver and age-related liver disease. *Front. Immunol.* (2018), , doi:10.3389/fimmu.2018.02795.
 21. D. M. Sabatini, Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2017), , doi:10.1073/pnas.1716173114.
 22. Y. S. Li, F. J. Zhang, C. Zeng, W. Luo, W. F. Xiao, S. G. Gao, G. H. Lei, Autophagy in osteoarthritis. *Jt. Bone Spine* (2016), , doi:10.1016/j.jbspin.2015.06.009.
 23. M. Mauthe, I. Orhon, C. Rocchi, X. Zhou, M. Luhr, K. J. Hijlkema, R. P. Coppes, N. Engedal, M. Mari, F. Reggiori, Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* (2018), doi:10.1080/15548627.2018.1474314.
 24. D. B. Bylund, D. C. Eikenberg, J. P. Hieble, S. Z. Langer, R. J. Lefkowitz, K. P. Minneman, P. B. Molinoff, R. R. Ruffolo, U. Trendelenburg, IV. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* (1994).
 25. G. B. Bolli, P. de Feo, S. de Cosmo, G. Perriello, M. M. Ventura, F. Calcinaro, C. Lolli, P. Campbell, P. Brunetti, J. E. Gerich, Demonstration of a dawn phenomenon in normal human volunteers. *Diabetes* (1984), doi:10.2337/diab.33.12.1150.
 26. W. Zeng, R. M. Pirzgalska, M. M. a Pereira, G. G. Martins, J. M. Friedman, A. I. Domingos Correspondence, N. Kubasova, A. Barateiro, E. Seixas, Y.-H. Lu, A. Kozlova, H. Voss, A. I. Domingos, Sympathetic Neuro-adipose Connections Mediate Leptin-Driven Lipolysis Optogenetic activation of sympathetic fibers in fat drives lipolysis and fat mass reduction Sympathetic Neuro-adipose Connections Mediate Leptin-Driven Lipolysis. *Cell* (2015), doi:10.1016/j.cell.2015.08.055.

27. W. He, S. Holtkamp, S. M. Hergenhan, K. Kraus, A. de Juan, J. Weber, P. Bradfield, J. M. P. Grenier, J. Pelletier, D. Druzd, C. S. Chen, L. M. Ince, S. Bierschenk, R. Pick, M. Sperandio, M. Aurrand-Lions, C. Scheiermann, Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte Subsets to Tissues. *Immunity* (2018), doi:10.1016/j.immuni.2018.10.007.
28. R. H. Straub, M. Mayer, M. Kreutz, S. Leeb, J. Scholmerich, W. Falk, Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. *J. Leukoc. Biol.* (2000), doi:10.1002/jlb.67.4.553.
29. S. Volpe, S. Thelen, T. Pertel, M. J. Lohse, M. Thelen, Polarization of migrating monocytic cells is independent of PI 3-kinase activity. *PLoS One* (2010), doi:10.1371/journal.pone.0010159.
30. E. Ortega, J. J. Garcia, M. De La Fuente, E. O. Rincón, Modulation of adherence and chemotaxis of macrophages by norepinephrine. Influence of ageing. *Mol. Cell. Biochem.* (2000), doi:10.1023/A:1007094614047.
31. R. M. Pirzgalska, E. Seixas, J. S. Seidman, V. M. Link, N. M. Sánchez, I. Mahú, R. Mendes, V. Gres, N. Kubasova, I. Morris, B. A. Arús, C. M. Larabee, M. Vasques, F. Tortosa, A. L. Sousa, S. Anandan, E. Tranfield, M. K. Hahn, M. Iannacone, N. J. Spann, C. K. Glass, A. I. Domingos, Sympathetic neuron-associated macrophages contribute to obesity by importing and metabolizing norepinephrine. *Nat. Med.* (2017), doi:10.1038/nm.4422.
32. H. Gao, P. Arner, G. Beauchef, C. Guéré, K. Vie, I. Dahlman, N. Mejhert, M. Rydén, Age-Induced Reduction in Human Lipolysis: A Potential Role for Adipocyte Noradrenaline Degradation. *Cell Metab.* (2020), doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.007.
33. H. Kanda, S. Tateya, Y. Tamori, K. Kotani, K. I. Hiasa, R. Kitazawa, S. Kitazawa, H. Miyachi, S. Maeda, K. Egashira, M. Kasuga, MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* (2006), doi:10.1172/JCI26498.
34. T. Skurk, C. Alberti-Huber, C. Herder, H. Hauner, Relationship between

- adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2007), doi:10.1210/jc.2006-1055.
35. M. Merad, J. C. Martin, Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* (2020), , doi:10.1038/s41577-020-0331-4.
 36. D. Nandy, R. Janardhanan, D. Mukhopadhyay, A. Basu, Effect of hyperglycemia on human monocyte activation. *J. Investig. Med.* (2011), doi:10.2310/JIM.0b013e31820ee432.
 37. R. Grosick, P. A. Alvarado-Vazquez, A. R. Messersmith, E. A. Romero-Sandoval, High glucose induces a priming effect in macrophages and exacerbates the production of pro-inflammatory cytokines after a challenge. *J. Pain Res.* (2018), doi:10.2147/JPR.S164493.
 38. S. Jordan, N. Tung, M. Casanova-Acebes, C. Chang, C. Cantoni, D. Zhang, T. H. Wirtz, S. Naik, S. A. Rose, C. N. Brocker, A. Gainullina, D. Hornburg, S. Horng, B. B. Maier, P. Cravedi, D. LeRoith, F. J. Gonzalez, F. Meissner, J. Ochando, A. Rahman, J. E. Chipuk, M. N. Artyomov, P. S. Frenette, L. Piccio, M. L. Berres, E. J. Gallagher, M. Merad, Dietary Intake Regulates the Circulating Inflammatory Monocyte Pool. *Cell* (2019), doi:10.1016/j.cell.2019.07.050.
 39. E. Dror, E. Dalmas, D. T. Meier, S. Wueest, J. Thévenet, C. Thienel, K. Timper, T. M. Nordmann, S. Traub, F. Schulze, F. Item, D. Vallois, F. Pattou, J. Kerr-Conte, V. Lavallard, T. Berney, B. Thorens, D. Konrad, M. Böni-Schnetzler, M. Y. Donath, Postprandial macrophage-derived IL-1 β stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation. *Nat. Immunol.* (2017), doi:10.1038/ni.3659.
 40. M. Leffler, T. Hrach, M. Stuerzl, R. E. Horch, D. N. Herndon, M. G. Jeschke, Insulin Attenuates Apoptosis and Exerts Anti-Inflammatory Effects in Endotoxemic Human Macrophages. *J. Surg. Res.* (2007), doi:10.1016/j.jss.2007.01.030.
 41. S. P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, A. W. Ferrante, Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* (2003), doi:10.1172/JCI200319246.

42. G. S. Hotamisligil, E. Erbay, Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* (2008), , doi:10.1038/nri2449.
43. O. Krenkel, T. Puengel, O. Govaere, A. T. Abdallah, J. C. Mossanen, M. Kohlhepp, A. Liepelt, E. Lefebvre, T. Luedde, C. Hellerbrand, R. Weiskirchen, T. Longerich, I. G. Costa, Q. M. Anstee, C. Trautwein, F. Tacke, Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. *Hepatology* (2018), doi:10.1002/hep.29544.
44. R. D. Leek, A. L. Harris, Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* (2002), , doi:10.1023/A:1020304003704.
45. S. Ma, S. Sun, L. Geng, M. Song, W. Wang, Y. Ye, Q. Ji, Z. Zou, S. Wang, X. He, W. Li, C. R. Esteban, X. Long, G. Guo, P. Chan, Q. Zhou, J. C. I. Belmonte, W. Zhang, J. Qu, G. H. Liu, Caloric Restriction Reprograms the Single-Cell Transcriptional Landscape of *Rattus Norvegicus* Aging. *Cell* (2020), doi:10.1016/j.cell.2020.02.008.
46. T. Marchini, D. Wolf, N. A. Michel, M. Mauler, B. Dufner, N. Hoppe, J. Beckert, M. Jäckel, N. Magnani, D. Duerschmied, D. Tasat, S. Alvarez, J. Reinöhl, C. von zur Muhlen, M. Idzko, C. Bode, I. Hilgendorf, P. Evelson, A. Zirlik, Acute exposure to air pollution particulate matter aggravates experimental myocardial infarction in mice by potentiating cytokine secretion from lung macrophages. *Basic Res. Cardiol.* (2016), doi:10.1007/s00395-016-0562-5.
47. M. N. Bouchlaka, G. D. Sckisel, M. Chen, A. Mirsoian, A. E. Zamora, E. Maverakis, D. E. C. Wilkins, K. L. Alderson, H. H. Hsiao, J. M. Weiss, A. M. Monjazebe, C. Hesdorffer, L. Ferrucci, D. L. Longo, B. R. Blazar, R. H. Wiltrout, D. Redelman, D. D. Taub, W. J. Murphy, Aging predisposes to acute inflammatory induced pathology after tumor immunotherapy. *J. Exp. Med.* (2013), doi:10.1084/jem.20131219.
48. J. C. W. Edwards, A. D. Sedgwick, D. A. Willoughby, The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: An in vivo tissue culture system. *J. Pathol.* (1981), doi:10.1002/path.1711340205.
49. P. Ralph, J. Prichard, M. Cohn, Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. *J. Immunol.* (1975).

50. M. R. Williams, D. M. Cauvi, I. Rivera, D. Hawisher, A. De Maio, Changes in macrophage function modulated by the lipid environment. *Innate Immun.* (2016), doi:10.1177/1753425916633886.
51. F. O. Martinez, A. Sica, A. Mantovani, M. Locati, Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* (2008), , doi:10.2741/2692.
52. D. J. Klionsky, K. Abdelmohsen, A. Abe, M. J. *et al.*, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* (2016), , doi:10.1080/15548627.2015.1100356.
53. A. M. Herrera-García, M. J. Domínguez-Luis, M. Arce-Franco, E. Armas-González, D. Álvarez de La Rosa, J. D. Machado, M. K. Pec, M. Feria, O. Barreiro, F. Sánchez-Madrid, F. Díaz-González, Prevention of Neutrophil Extravasation by $\alpha 2$ -Adrenoceptor–Mediated Endothelial Stabilization. *J. Immunol.* (2014), doi:10.4049/jimmunol.1400255.
54. M. Ponzoni, F. Pastorino, D. Di Paolo, P. Perri, C. Brignole, Targeting macrophages as a potential therapeutic intervention: Impact on inflammatory diseases and cancer. *Int. J. Mol. Sci.* (2018), , doi:10.3390/ijms19071953.
55. Y. Oishi, I. Manabe, Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. *npj Aging Mech. Dis.* (2016), doi:10.1038/npjamd.2016.18.
56. Y. Jiang, Y. Zhao, X. Zhu, Y. Liu, B. Wu, Y. Guo, B. Liu, X. Zhang, Effects of autophagy on macrophage adhesion and migration in diabetic nephropathy. *Ren. Fail.* (2019), doi:10.1080/0886022X.2019.1632209.
57. M. C. Flynn, G. Pernes, M. K. S. Lee, P. R. Nagareddy, A. J. Murphy, Monocytes, macrophages, and metabolic disease in atherosclerosis. *Front. Pharmacol.* (2019), , doi:10.3389/fphar.2019.00666.
58. N. V. Serbina, E. G. Pamer, Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* (2006), doi:10.1038/ni1309.
59. C. Shi, T. Jia, S. Mendez-Ferrer, T. M. Hohl, N. V. Serbina, L. Lipuma, I. Leiner, M. O. Li, P. S. Frenette, E. G. Pamer, Bone Marrow Mesenchymal Stem and Progenitor Cells Induce Monocyte Emigration in Response to Circulating Toll-

- like Receptor Ligands. *Immunity* (2011), doi:10.1016/j.immuni.2011.02.016.
60. J. Zhao, W. Bi, S. Xiao, X. Lan, X. Cheng, J. Zhang, D. Lu, W. Wei, Y. Wang, H. Li, Y. Fu, L. Zhu, Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci. Rep.* (2019), doi:10.1038/s41598-019-42286-8.
 61. J. E. Bader, R. T. Enos, K. T. Velázquez, M. S. Carson, A. T. Sougiannis, O. P. McGuinness, C. M. Robinson, E. A. Murphy, Repeated clodronate-liposome treatment results in neutrophilia and is not effective in limiting obesity-linked metabolic impairments. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* (2019), doi:10.1152/ajpendo.00438.2018.
 62. ▼ Guanfacine for ADHD in children and adolescents. *Drug Ther. Bull.* (2016), doi:10.1136/dtb.2016.5.0402.
 63. F. Y. McWhorter, T. Wang, P. Nguyen, T. Chung, W. F. Liu, Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2013), doi:10.1073/pnas.1308887110.
 64. W. Ying, P. S. Cheruku, F. W. Bazer, S. H. Safe, B. Zhou, Investigation of macrophage polarization using bone marrow derived macrophages. *J. Vis. Exp.* (2013), doi:10.3791/50323.
 65. D. Zhang, R. Guo, L. Lei, H. Liu, Y. Wang, Y. Wang, T. Dai, T. Zhang, Y. Lai, J. Wang, Z. Liu, A. He, M. O'Dwyer, J. Hu, COVID-19 infection induces readily detectable morphological and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes, the severity of which correlate with patient outcome. *medRxiv* (2020), doi:10.1101/2020.03.24.20042655.
 66. L. Zhu, Z. G. She, X. Cheng, J. J. Qin, X. J. Zhang, J. Cai, F. Lei, H. Wang, J. Xie, W. Wang, H. Li, P. Zhang, X. Song, X. Chen, M. Xiang, C. Zhang, L. Bai, D. Xiang, M. M. Chen, Y. Liu, Y. Yan, M. Liu, W. Mao, J. Zou, L. Liu, G. Chen, P. Luo, B. Xiao, C. Zhang, Z. Zhang, Z. Lu, J. Wang, H. Lu, X. Xia, D. Wang, X. Liao, G. Peng, P. Ye, J. Yang, Y. Yuan, X. Huang, J. Guo, B. H. Zhang, H. Li, Association of Blood Glucose Control and Outcomes in Patients with COVID-19 and Pre-existing Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* (2020), doi:10.1016/j.cmet.2020.04.021.

67. N. Shanmugam, M. A. Reddy, M. Guha, R. Natarajan, High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes* (2003), doi:10.2337/diabetes.52.5.1256.
68. Z. Jin, Y. Li, R. Pitti, D. Lawrence, V. C. Pham, J. R. Lill, A. Ashkenazi, Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling. *Cell* (2009), doi:10.1016/j.cell.2009.03.015.
69. X. Li, F. Liu, X. Zhang, G. Shi, J. Ren, J. Ji, L. Ding, H. Fan, H. Dou, Y. Hou, Notch-Hes-1 axis controls TLR7-mediated autophagic death of macrophage via induction of P62 in mice with lupus. *Cell Death Dis.* (2016), doi:10.1038/cddis.2016.244.
70. L. Fan, S. Yin, E. Zhang, H. Hu, Role of p62 in the regulation of cell death induction. *Apoptosis* (2018), , doi:10.1007/s10495-018-1445-z.
71. M. Miksa, P. Das, M. Zhou, R. Wu, W. Dong, Y. Ji, S. M. Goyert, T. S. Ravikumar, P. Wang, Pivotal role of the α 2A-adrenoceptor in producing inflammation and organ injury in a rat model of sepsis. *PLoS One* (2009), doi:10.1371/journal.pone.0005504.
72. S. Gyoneva, S. F. Traynelis, Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* (2013), doi:10.1074/jbc.M113.458901.
73. J. Leong, M. Zhou, A. Jacob, P. Wang, Aging-related hyperinflammation in endotoxemia is mediated by the α 2A-adrenoceptor and CD14/TLR4 pathways. *Life Sci.* (2010), doi:10.1016/j.lfs.2010.03.009.
74. H. Wajant, D. Siegmund, TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and death balance of macrophages. *Front. Cell Dev. Biol.* (2019), , doi:10.3389/fcell.2019.00091.
75. T. M. Tran, V. Temkin, B. Shi, L. Pagliari, S. Daniel, C. Ferran, R. M. Pope, TNF α -induced macrophage death via caspase-dependent and independent pathways. *Apoptosis* (2009), doi:10.1007/s10495-009-0311-4.
76. H. Xu, G. T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C. J. Chou, J. Sole, A. Nichols,

- J. S. Ross, L. A. Tartaglia, H. Chen, Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* (2003), doi:10.1172/JCI200319451.
77. S. J. Richardson, A. Willcox, A. J. Bone, A. K. Foulis, N. G. Morgan, Islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetologia* (2009), , doi:10.1007/s00125-009-1410-z.
78. J. A. Ehses, A. Perren, E. Eppler, P. Ribaux, J. A. Pospisilik, R. Maor-Cahn, X. Gueripel, H. Ellingsgaard, M. K. J. Schneider, G. Biollaz, A. Fontana, M. Reinecke, F. Homo-Delarche, M. Y. Donath, Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* (2007), doi:10.2337/db06-1650.
79. P. Wenzel, M. Knorr, S. Kossmann, J. Stratmann, M. Hausding, S. Schuhmacher, S. H. Karbach, M. Schwenk, N. Yogev, E. Schulz, M. Oelze, S. Grabbe, H. Jonuleit, C. Becker, A. Daiber, A. Waisman, T. Münzel, Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin ii-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *Circulation* (2011), doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.034470.
80. L. Huang, A. Wang, Y. Hao, W. Li, C. Liu, Z. Yang, F. Zheng, M. S. Zhou, Macrophage depletion lowered blood pressure and attenuated hypertensive renal injury and fibrosis. *Front. Physiol.* (2018), doi:10.3389/fphys.2018.00473.
81. D. Nejman, I. Livyatan, G. Fuks, N. Gavert, Y. Zvang, L. T. Geller, A. Rotter-Maskowitz, R. Weiser, G. Mallel, E. Gigi, A. Meltser, G. M. Douglas, I. Kamer, V. Gopalakrishnan, T. Dadosh, S. Levin-Zaidman, S. Avnet, T. Atlan, Z. A. Cooper, R. Arora, A. P. Cogdill, M. A. W. Khan, G. Ologun, Y. Bussi, A. Weinberger, M. Lotan-Pompan, O. Golani, G. Perry, M. Rokah, K. Bahar-Shany, E. A. Rozeman, C. U. Blank, A. Ronai, R. Shaoul, A. Amit, T. Dorfman, R. Kremer, Z. R. Cohen, S. Harnof, T. Siegal, E. Yehuda-Shnaidman, E. N. Gal-Yam, H. Shapira, N. Baldini, M. G. I. Langille, A. Ben-Nun, B. Kaufman, A. Nissan, T. Golan, M. Dadiani, K. Levanon, J. Bar, S. Yust-Katz, I. Barshack, D. S. Peeper, D. J. Raz, E. Segal, J. A. Wargo, J. Sandbank, N. Shental, R. Straussman, The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science* (2020), doi:10.1126/science.aay9189.

82. J. Condeelis, J. W. Pollard, Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* (2006), , doi:10.1016/j.cell.2006.01.007.
83. H. Shoulders, K. H. Garner, D. K. Singla, Macrophage depletion by clodronate attenuates bone morphogenetic protein-7 induced M2 macrophage differentiation and improved systolic blood velocity in atherosclerosis. *Transl. Res.* (2019), doi:10.1016/j.trsl.2018.07.006.
84. V. Z. Rocha, P. Libby, Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* (2009), doi:10.1038/nrcardio.2009.55.
85. K. Kazankov, S. M. D. Jørgensen, K. L. Thomsen, H. J. Møller, H. Vilstrup, J. George, D. Schuppan, H. Grønbaek, The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* (2019), , doi:10.1038/s41575-018-0082-x.
86. X. Lan, X. Han, Q. Li, Q. W. Yang, J. Wang, Modulators of microglial activation and polarization after intracerebral haemorrhage. *Nat. Rev. Neurol.* (2017), , doi:10.1038/nrneurol.2017.69.
87. M. Vomero, V. Manganelli, C. Barbati, T. Colasanti, A. Capozzi, A. Finucci, F. R. Spinelli, F. Ceccarelli, C. Perricone, S. Truglia, S. Morrone, R. Maggio, R. Misasi, M. Bombardieri, M. Di Franco, F. Conti, M. Sorice, G. Valesini, C. Alessandri, Reduction of autophagy and increase in apoptosis correlates with a favorable clinical outcome in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF drugs. *Arthritis Res. Ther.* (2019), doi:10.1186/s13075-019-1818-x.
88. Y. Hu, B. Wang, J. Shen, S. A. Low, K. S. Putt, H. W. M. Niessen, E. L. Matteson, L. Murphy, C. Ruppert, G. Jansen, S. J. Oliver, Y. Feng, D. S. Dimitrov, C. Nickerson-Nutter, P. S. Low, Depletion of activated macrophages with a folate receptor-beta-specific antibody improves symptoms in mouse models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* (2019), doi:10.1186/s13075-019-1912-0.
89. J. Wang, J. Wang, J. Wang, B. Yang, Q. Weng, Q. He, Targeting microglia and macrophages: A potential treatment strategy for multiple sclerosis. *Front. Pharmacol.* (2019), doi:10.3389/fphar.2019.00286.
90. D. Y. S. Vogel, E. J. F. Vereyken, J. E. Glim, P. D. A. M. Heijnen, M. Moeton,

- P. van der Valk, S. Amor, C. E. Teunissen, J. van Horssen, C. D. Dijkstra, Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J. Neuroinflammation* (2013), doi:10.1186/1742-2094-10-35.
91. A. Suárez-Fueyo, J. M. Rojas, A. E. Cariaga, E. García, B. H. Steiner, D. F. Barber, K. D. Puri, A. C. Carrera, Inhibition of PI3K δ Reduces Kidney Infiltration by Macrophages and Ameliorates Systemic Lupus in the Mouse. *J. Immunol.* (2014), doi:10.4049/jimmunol.1400350.
 92. S. sang J. Sung, S. M. Fu, Interactions among glomerulus infiltrating macrophages and intrinsic cells via cytokines in chronic lupus glomerulonephritis. *J. Autoimmun.* (2020), doi:10.1016/j.jaut.2019.102331.
 93. R. A. Clark, T. S. Kupper, Misbehaving macrophages in the pathogenesis of psoriasis. *J. Clin. Invest.* (2006), , doi:10.1172/JCI29441.
 94. R. Leite Dantas, D. Masemann, T. Schied, V. Bergmeier, T. Vogl, K. Loser, B. Brachvogel, G. Varga, S. Ludwig, V. Wixler, Macrophage-mediated psoriasis can be suppressed by regulatory T lymphocytes. *J. Pathol.* (2016), doi:10.1002/path.4786.
 95. M. Roschewski, M. S. Lionakis, J. P. Sharman, J. Roswarski, A. Goy, M. A. Monticelli, M. Roshon, S. H. Wrzesinski, J. V. Desai, M. A. Zarakas, J. Collen, K. Rose, A. Hamdy, R. Izumi, G. W. Wright, K. K. Chung, J. Baselga, L. M. Staudt, W. H. Wilson, Inhibition of Bruton tyrosine kinase in patients with severe COVID-19. *Sci. Immunol.* (2020), doi:10.1126/sciimmunol.abd0110.
 96. P. Thériault, A. Elali, S. Rivest, The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res. Ther.* (2015), , doi:10.1186/s13195-015-0125-2.
 97. T. Malm, M. Koistinaho, A. Muona, J. Magga, J. Koistinaho, The role and therapeutic potential of monocytic cells in Alzheimer's disease. *Glia* (2010), , doi:10.1002/glia.20973.
 98. C. Warren Olanow, M. Savolainen, Y. Chu, G. M. Halliday, J. H. Kordower, Temporal evolution of microglia and α -synuclein accumulation following foetal grafting in Parkinson's disease. *Brain* (2019), doi:10.1093/brain/awz104.

99. Y. Du, W. Zhao, J. R. Thonhoff, J. Wang, S. Wen, S. H. Appel, Increased activation ability of monocytes from ALS patients. *Exp. Neurol.* (2020), doi:10.1016/j.expneurol.2020.113259.
100. M. C. Graves, M. Fiala, L. A. V. Dinglasan, N. Q. Liu, J. Sayre, F. Chiappelli, C. van Kooten, H. V. Vinters, Inflammation in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord and brain is mediated by activated macrophages, mast cells and t cells. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Mot. Neuron Disord.* (2004), doi:10.1080/14660820410020286.
101. J. Steiner, M. Walter, T. Gos, G. J. Guillemin, H. G. Bernstein, Z. Sarnyai, C. Mawrin, R. Brisch, H. Bielau, L. M. zu Schwabedissen, B. Bogerts, A. M. Myint, Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: Evidence for an immune-modulated glutamatergic neurotransmission? *J. Neuroinflammation* (2011), doi:10.1186/1742-2094-8-94.
102. J. Steiner, H. Bielau, R. Brisch, P. Danos, O. Ullrich, C. Mawrin, H. G. Bernstein, B. Bogerts, Immunological aspects in the neurobiology of suicide: Elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J. Psychiatr. Res.* (2008), doi:10.1016/j.jpsychires.2006.10.013.
103. T. A. Bayer, R. Buslei, L. Havas, P. Falkai, Evidence for activation of microglia in patients with psychiatric illnesses. *Neurosci. Lett.* (1999), doi:10.1016/S0304-3940(99)00545-5.
104. K. Radewicz, L. J. Garey, S. M. Gentleman, R. Reynolds, Increase in HLA-DR immunoreactive microglia in frontal and temporal cortex of chronic schizophrenics. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* (2000), doi:10.1093/jnen/59.2.137.
105. D. L. Vargas, C. Nascimbene, C. Krishnan, A. W. Zimmerman, C. A. Pardo, Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.* (2005), doi:10.1002/ana.20315.
106. J. T. Morgan, G. Chana, C. A. Pardo, C. Achim, K. Semendeferi, J. Buckwalter, E. Courchesne, I. P. Everall, Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol. Psychiatry* (2010), doi:10.1016/j.biopsych.2010.05.024.

107. I. Maezawa, L. W. Jin, Rett syndrome microglia damage dendrites and synapses by the elevated release of glutamate. *J. Neurosci.* (2010), doi:10.1523/JNEUROSCI.5966-09.2010.
108. A. Morer, W. Chae, O. Henegariu, A. L. M. Bothwell, J. F. Leckman, I. Kawikova, Elevated expression of MCP-1, IL-2 and PTPR-N in basal ganglia of Tourette syndrome cases. *Brain. Behav. Immun.* (2010), doi:10.1016/j.bbi.2010.02.007.