

PAPEL DE LOS RECEPTORES ALPHA2 ADRENÉRGICOS EN LA ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS IN VITRO

ALUMNA: ANDREA DÍAZ LÓPEZ

TUTORES: JOSE FEDERICO DÍAZ GONZÁLEZ Y JAVIER CASTRO HERNÁNDEZ



Trabajo Fin de Grado
Conformidad para la presentación de la memoria y defensa

Los Profs José Federico Díaz González y Javier Castro Hernández, tutor y cotutor, respectivamente del trabajo realizado por la alumna Andrea Díaz López con el título "Papel de los receptores alpha2 adrenérgicos en la activación de macrófagos *in vitro*" damos nuestra aprobación para la presentación de la memoria y a su defensa como Trabajo Fin de Grado.

La Laguna, 1 de junio de 2021

Firmado:

Firmado:

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: 3473789 Código de verificación: 8EMbIG98

Firmado por: José Federico Díaz González Fecha: 01/06/2021 07:55:25
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Javier Rafael Castro Hernández 01/06/2021 07:56:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

RESUMEN

La estirpe celular monocito/macrófago es claves en el inicio y desarrollo de las enfermedades de naturaleza inflamatoria. Estas patologías se caracterizan por una infiltración exacerbada de macrófagos en diferentes tejidos, promoviendo una inflamación sistémica, que va desde formas leves a reacciones graves (como el síndrome de tormenta de citoquinas en la COVID-19) que incluso pueden comprometer la vida de los pacientes. En este proyecto, utilizando una línea celular de monocitos/macrófagos de origen murino, la 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 describían que los agonistas de los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos reducen la presencia de células mieloides (monocitos y neutrófilos) en el foco inflamatorio. La combinación de los resultados presentados en este trabajo con futuros experimentos utilizando modelos de inflamación in vivo pueden apoyar la traslación a la clínica de la actividad $\alpha 2$ -adrenérgica como diana terapéutica para el manejo de procesos patológicos que tengan en común la infiltración descontrolada de macrófagos.

Palabras clave: *Macrófagos, Tormenta de citoquinas, Receptor $\alpha 2$ -adrenérgicos*

ABSTRACT

The monocyte/macrophage cell lineage play a key role in the initiation and development of diseases of inflammatory nature. These pathologies are characterized by an exacerbated infiltration of macrophages in different tissues, promoting systemic inflammation, ranging from mild forms to severe reactions (such as cytokine storm syndrome in COVID-19) that even can compromise the life of patients. In this project, using a murine monocyte/macrophage cell line, J774.2, we have identified cell subpopulations in culture that show phenotypic differences in 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 describing that $\alpha 2$ -adrenergic receptor agonists reduce the presence of myeloid cells (monocytes and neutrophils) in the inflammatory focus. The combination of results presented in this work with future experiments using in vivo inflammation models may support the translation to the clinic of $\alpha 2$ -adrenergic activity as a therapeutic target for the management of pathological processes that have in common the uncontrolled infiltration of macrophages.

Keywords: *Macrophages, Cytokine Storm, $\alpha 2$ -adrenergic receptor*

ÍNDICE

1. Introducción.....	5
1.1. El Sistema inmune.....	5
1.2. Inmunidad innata.....	5
1.3. Inmunidad adquirida.....	5
1.4. Monocitos/Macrófagos.....	6
1.5. Activación y polarización de macrófagos.....	6
1.6. Autofagia y polarización de macrófagos.....	7
1.7. COVID-19 y macrófagos.....	8
1.8. Síndrome de tormenta de citoquinas.....	8
1.9. Receptores α 2-adrenérgicos.....	9
2. Hipótesis.....	9
3. Objetivos.....	9
4. Material y métodos	10
4.1. Cultivos celulares y tratamientos.....	10
4.2. Citometría de flujo	10
4.3. Inmunotransferencia (“western-blot”).....	11
4.4. Análisis estadístico”).....	11
5. Resultados.	12
6. Discusión.....	15
7. Conclusiones	17
8. ¿Qué has aprendido?	17
9. Bibliografía.....	18

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El Sistema inmune

El sistema inmune distingue lo propio de lo ajeno identificando y eliminando las moléculas, microorganismos y las células ajenas. El sistema inmune también puede reconocer y destruir células anormales derivadas de los tejidos del huésped; células dañadas o tumorales. Cualquier molécula capaz de ser reconocida por el sistema inmune adaptativo se denomina antígeno (Ag).

La primera línea de defensa del organismo son las barreras físicas (piel, córnea, mucosas), que estas a su vez también tienen funciones inmunitarias activas. La rotura de las barreras anatómicas puede desencadenar dos tipos de respuesta inmunitaria: La respuesta innata y la respuesta adaptativa (adquirida). La defensa inmunitaria satisfactoria requiere la activación, regulación y resolución de la respuesta inmunitaria.

1.2. Inmunidad innata

La inmunidad innata o natural, es eficaz sin la exposición previa a un antígeno (es decir, memoria inmunológica). Así, puede responder de inmediato (minutos/horas) a un invasor, generando una respuesta inespecífica (reconoce patrones) y estereotípica (la respuesta es similar frente a la mayoría de patógenos. Además, no genera memoria (la resistencia del huésped no mejora por la infección repetida).

Sus componentes incluyen: Células fagocíticas (p. ej., neutrófilos, monocitos-macrófagos), células linfoides innatas (p. ej., NK), leucocitos polimorfonucleares, Proteína C reactiva, citoquinas, fiebre e inflamación.

Las células fagocitarias (neutrófilos en la sangre y los tejidos, monocitos en la sangre, macrófagos en los tejidos) ingieren y destruyen los antígenos invasores.

1.3. Inmunidad adquirida

La inmunidad adquirida (adaptativa) requiere la exposición previa a un antígeno y, por ende, lleva tiempo desarrollarla después de un encuentro inicial con un invasor nuevo (días/semanas). Se trata de una respuesta extremadamente específica, puesto que reconoce antígenos y muy especializada, ya que la respuesta varía según el tipo de microorganismo. Es una respuesta que, además, genera memoria, lo que permite que, ante una segunda exposición al antígeno, la respuesta sea rápida.

Sus componentes incluyen: linfocitos B y T, inmunidad mediada por células (deriva de ciertas respuestas de células T) e inmunidad humoral (deriva de las respuestas de linfocitos B).

1.4. Monocitos/Macrófagos

Los monocitos circulantes en sangre son precursores de los macrófagos tisulares. Los monocitos migran a los tejidos, donde en unas 8 h evolucionan a macrófagos por la influencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), secretado por varios tipos celulares (p. ej., células endoteliales, fibroblastos) (1). En las zonas de infección, los linfocitos T activados secretan mediadores inflamatorios denominados citoquinas (p. ej., interferón-gamma [IFN-gamma]) que inducen la producción del factor inhibidor de la migración de los macrófagos, lo cual evita que los macrófagos abandonen la zona (1).

Los macrófagos juegan un rol clave en la vía inflamatoria. Se activan por la acción de citoquinas (p. ej., IFN-gamma, interleucina (IL)-4, IL-13) y por diversos componentes microbianos (p. ej., lipopolisacárido (LPS)). Los macrófagos activados eliminan microorganismos patógenos y secretan citoquinas (p. ej., factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α], IL-10). En base a diferentes perfiles de expresión génica y liberación de citoquinas, se han identificado los subtipos de macrófagos M1 y M2, denominación que hace alusión a su estado de activación pro-inflamatoria o anti-inflamatoria, respectivamente.

1.5. 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 (2).

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, por tanto, considerados proinflamatorios y, por otro lado, los “alternativamente activados” o M2, que poseen propiedades antiinflamatorias y están implicados en homeostasis tisular (3).

La activación clásica de los macrófagos se produce después de una lesión o infección por agentes como productos microbianos o citoquinas proinflamatorias, incluidos los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), el interferón- γ (IFN- γ) o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (4)

Los M1 están caracterizados por la producción de elevados niveles de citoquinas proinflamatorias, la 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.

Un equilibrio óptimo entre los macrófagos M1 y M2 es muy importante para la regulación inmune, ya que se esperaría que cualquier desequilibrio en los dos estados provocará la desregulación de la vía inmune.

1.6. Autofagia y polarización de macrófagos

La autofagia es un proceso celular catabólico que implica la formación de autofagosomas que encierran una carga citoplásmica, incluidas proteínas de larga duración, agregados de proteínas y organelas defectuosas, y entregan esta carga a su vez a los lisosomas para su degradación (5).

La polarización de los macrófagos es mediada por rutas metabólicas intracelulares donde la diana para rapamicina en mamíferos (mTOR) juega un papel crucial (6). mTOR es el interruptor del metabolismo celular. Su activación promueve el anabolismo celular, es decir, la proliferación y la síntesis proteica (importantísima en macrófagos cuando se polarizan a un estado proinflamatorio; M1). Por el contrario, la inhibición de mTOR lleva a la activación de autofagia, que actúa como inmunosupresora. (7).

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. Por lo tanto, la modulación de la autofagia parece clave en la polarización de los macrófagos hacia M1 o M2, inhibiendo o activando, respectivamente (8).

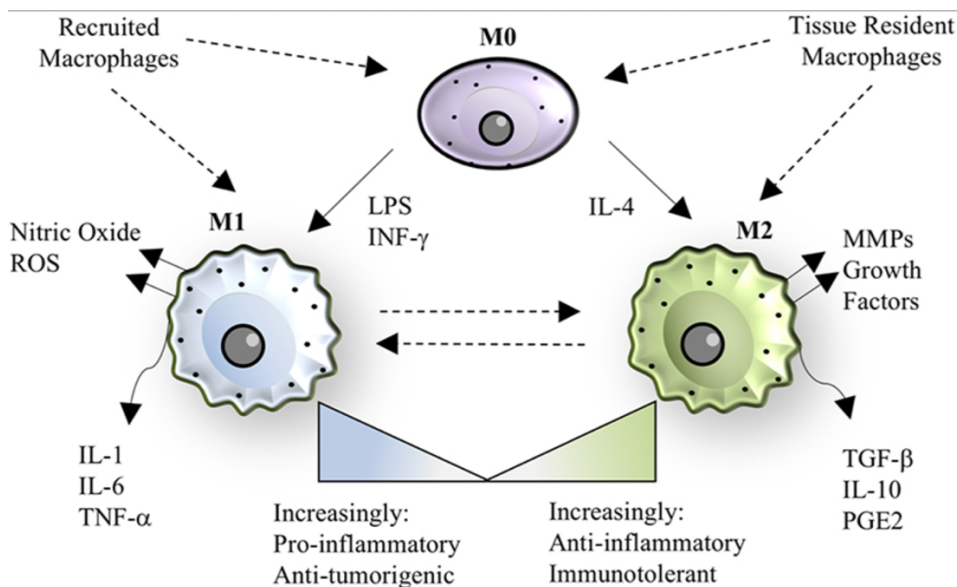


Figura 1: Polarización de macrófagos. Stahl *et al.*, 2018. (20). El modelo de la polarización de macrófagos comienza con una célula M0 (monocitos/poblaciones de tejidos). La transición de M0 a M1 puede ser estimulada por lipopolisacárido (LPS) o interferón-gamma, dando como resultado una célula que tiene propiedades proinflamatorias. La transición de M0 a M2 puede ser estimulada por la IL-4, dando como resultado una célula que tiene propiedades antiinflamatorias. Ambos fenotipos (M1 y M2) son dinámicos y existen en un espectro, donde los macrófagos reclutados tienden a ser más similares a M1, y los macrófagos residentes en tejidos tienden a ser más "similares a M2" durante la homeostasis.

1.7. COVID-19 y macrófagos

En el alveolo pulmonar hay dos tipos de macrófagos: los residentes y los migrados. Los macrófagos alveolares residentes que se localizan en la interfaz aire-tejido, muestran mayoritariamente un fenotipo M2 (9). El segundo tipo, el macrófago alveolar migrado lo constituyen monocitos circulantes en sangre periférica reclutados en el lumen alveolar en respuesta a un estímulo como el daño pulmonar o a un síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), como ocurre en la infección por SARS-Cov-2 (10). En el alveolo, este segundo tipo de macrófago adquiere un fenotipo M1, proinflamatorio, caracterizado por la liberación de citoquinas. En la patogenia de la inflamación pulmonar en la COVID-19, los macrófagos activados por el SARS-CoV-2 juegan un papel importante fagocitando detritus celulares y células muertas y liberando citoquinas proinflamatorias como IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF)- α o IL-1 β (9). En este sentido se ha sugerido que la depleción de macrófagos puede ser una buena estrategia para controlar la inflamación en la etapa tardía del síndrome de distrés respiratorio agudo (11).

1.8. Síndrome de tormenta de citoquinas

El síndrome de tormenta de citoquinas (STC), es un término general que abarca varios trastornos de desregulación inmunitaria caracterizados por síntomas constitucionales, inflamación sistémica y disfunción multiorgánica que puede conducir a insuficiencia multiorgánica (12). Es por tanto, un síndrome inflamatorio sistémico potencialmente mortal que involucra niveles elevados de citoquinas circulantes e hiperactivación del sistema inmune que pueden desencadenarse por diversas causas como patógenos (SARS-CoV-2), cánceres o trastornos autoinmunes (12).

Aunque los impulsores iniciales pueden diferir, las manifestaciones clínicas en etapa tardía del STC convergen y, a menudo, se superponen. Los pacientes pueden presentar fiebre, fatiga, anorexia, cefalea, exantema, diarrea, artralgia, mialgia y hallazgos neuropsiquiátricos. Estos síntomas pueden deberse directamente al daño tisular inducido por citoquinas, cambios fisiológicos de fase aguda o pueden ser el resultado de respuestas mediadas por células inmunitarias. Los casos pueden progresar rápidamente a coagulación intravascular diseminada (CID) con oclusión vascular y hemorragias por consumo de los factores de la coagulación, disnea, hipoxemia, hipotensión, desequilibrio hemostático y muerte (13). Muchos pacientes tienen síntomas respiratorios, que incluyen tos y taquipnea, que pueden progresar a SDRA y pueden requerir ventilación mecánica (14). La combinación de hiperinflamación, coagulopatía y recuentos plaquetarios bajos coloca a los pacientes con STC en alto riesgo de hemorragia espontánea.

Aunque la STC es fácil de identificar, la línea entre una respuesta normal y desregulada a una infección grave es borrosa, especialmente considerando que ciertas citoquinas pueden ser útiles para controlar una infección y ser dañinas al huésped. La interdependencia de estos mediadores inflamatorios complica aún más la distinción entre una respuesta normal y una desregulada.

1.9. Receptores α 2-adrenérgicos

Existen fármacos que directamente inhiben el complejo mTOR e inducen autofagia, como es el caso de la rapamicina (15), o que la inhiben, como la hidroxiclороquina, que evita la fusión de los autofagosomas con los lisosomas (16). Ambos tipos de fármacos tienen una actividad sistémica, actuando en dianas que se expresan en todos los tipos celulares.

Sin embargo, podemos modularla 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, 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: α 1A, α 1B, α 1D, α 2A, α 2B, α 2C, β 1, β 2 y β 3 (17). 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 (α 1), antihipertensivos (α 2), para el manejo del shock cardiogénico (β 1) o para el control del asma y EPOC (β 2). Sin embargo, la implicación de los receptores α 2-adrenérgicos en la respuesta inflamatoria y, en concreto su expresión en los macrófagos, está poco estudiada.

2. HIPÓTESIS

Los agonistas α 2-adrenérgicos inducen apoptosis de macrófagos activados *in vitro*.

3. OBJETIVOS

- Estudiar la activación de macrófagos *in vitro* por LPS.
- Investigar si los agonistas α 2-adrenérgicos son efectivos en el control de la población de macrófagos activados y su mecanismo de acción.
- Comprobar si los agonistas α 2-adrenérgicos reducen la liberación de citoquinas proinflamatorias *in vitro*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. 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 (ref). Se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina (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 Clorhidrato de Guanfacina [100 μ M] durante 24 horas (Sigma-Aldrich).

4.2. 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 μ l de FACS buffer (buffer salino PBS + 1% de suero fetal bovino, FBS).

A continuación, añadimos anticuerpo conjugado con ficoeritrina (PE) (Miltenyi Biotec; CCR2) o con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (Miltenyi Biotec; p-BTK). El anticuerpo anti Adra2a (Santa Cruz Biotechnology) al no ser conjugado con fluoróforo, fue incubado 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 μ l 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 celular 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.

Para la cuantificación de citoquinas en sobrenadante de las células se utilizó el “Cytometric Bead Array”, una aplicación para citometría de flujo de BD que permite cuantificar simultáneamente múltiples citoquinas.

4.3. 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). 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, alpha-tubulina (Sigma; 1: 5000).

4.4. 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).

5. RESULTADOS

La guanfacina induce la depleción de macrófagos activados *in vitro* por LPS

La línea celular murina de monocitos/macrófagos J774.2 presenta basalmente dos tipos de células: unas más redondeadas y pequeñas (flecha negra), y otras células de mayor tamaño y alargadas (flecha roja) (**Fig. 2A**). La activación con LPS de estas células induce un aumento de tamaño y una depleción que viene asociada a la mayor activación (**Fig. 2B**). La combinación de GF y LPS consigue reducir en una la cantidad de macrófagos en cultivo como podemos observar por microscopía de contraste de fases (**Fig. 2A**) y por citometría de flujo (GF+LPS, -55,65%, $p < 0.0001$; **Fig. 2B**). Nuestros resultados indican que no sólo hay cambios en el número de células, sino en el tamaño y morfología de las mismas. En presencia de GF, las células alargadas de mayor tamaño desaparecen (**Fig 2A**).

Otros autores han relacionado el tamaño de los macrófagos con una mayor activación pro-inflamatoria (21), por ello centramos nuestros estudios en las poblaciones de células grandes. Experimentos por citometría de flujo, estudiando el tamaño medio de las células grandes (FSC-A) indican que la GF reduce el tamaño medio de la población tanto en ausencia como en combinación con LPS (-19,83% y -21,83%, respectivamente; $p < 0.01$; **Fig. 2C**), mientras que LPS aumenta el tamaño medio de las células, como también se aprecia por microscopía de contraste de fase (+4,7%, $p < 0.01$; **Fig. 2C**). Estos resultados sugieren que la GF es eficaz en el control de población de macrófagos activados *in vitro*.

La apoptosis de macrófagos está asociada a una mayor activación

Para estudiar la depleción de macrófagos observada en el apartado anterior decidimos estudiar el estado de apoptosis/necrosis mediante el empleo de un kit que marca células apoptóticas (anexina V) y necróticas (ioduro de propidio) (Annexin V FITC Apoptosis Detection kit, Sigma). Nuestros datos preliminares indican que la combinación de LPS + GF induce un aumento de las células que se encuentran en apoptosis/necrosis (**Fig. 2D**). Además, estudiamos el posible mecanismo implicado en esta apoptosis, estudiando si la ruta autofagia-lisosoma se encontraba alterada. Nuestros resultados indican que la GF induce una inhibición de la autofagia, como podemos observar mediante citometría de flujo (Autophagy assay kit, Sigma) y por western-blot, donde encontramos que la GF promueve la acumulación de p62, proteína que se ha descrito como inductora de apoptosis en macrófagos (22), y LC3-II, marcadores de autofagia (**Fig. 2E**).

Para confirmar la mayor activación pro-inflamatoria de las células utilizamos diferentes marcadores. Datos previos de nuestro laboratorio, indican que la expresión del receptor $\alpha 2A$ adrenérgico, diana de la GF, no es detectable en condiciones basales. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la combinación de LPS+GF aumentan su expresión en un 235,8% (**Fig. 2F**; $p < 0.01$).

La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1 / CCL2, usados de forma indistinta) es una de las quimioquinas clave que regulan la migración y la infiltración de monocitos / macrófagos. Se ha demostrado que tanto CCL2 como su receptor CCR2 son inducidos e implicados en diversas enfermedades y necesario para la migración de los monocitos al foco inflamatorio (18). En este experimento también aumentó su expresión en un 179,5% (**Fig. 2F**; $p < 0.01$).

Por último, la expresión de la proteína tirosina quinasa Bruton fosforilada (p-btk), que desencadena una cascada de eventos de señalización que culminan en la generación de flujos y movilización de calcio, reordenamientos citoesqueléticos y regulación en la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (19), también aumentó su expresión en un 168,3% (**Fig. 2F**; $p < 0.05$).

La guanfacina reduce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en J744.2 activadas

A pesar de la mayor activación de las células con LPS en combinación con GF, la GF causa una elevada depleción de estos macrófagos, lo que nos hacía pensar que podía tener un efecto en la liberación de citoquinas y podría tener un potencial efecto terapéutico en la tormenta de citoquinas. Nuestros datos preliminares indican que en condiciones basales sólo detectamos CCL2 (MCP-1). Pero cuando activamos las células con LPS detectamos además TNF- α e IL-6 (citoquinas pro-inflamatorias). La depleción celular inducida por la GF sobre las células activadas consigue reducir los niveles de TNF- α e IL-6 en un 41,35% y en un 53,25%, respectivamente (**Fig. 2G**; $p < 0.05$). Además, GF consigue reducir CCL2 con respecto al control (**Fig. 2G**; -44,77%, $p < 0.001$).

FIGURA 2

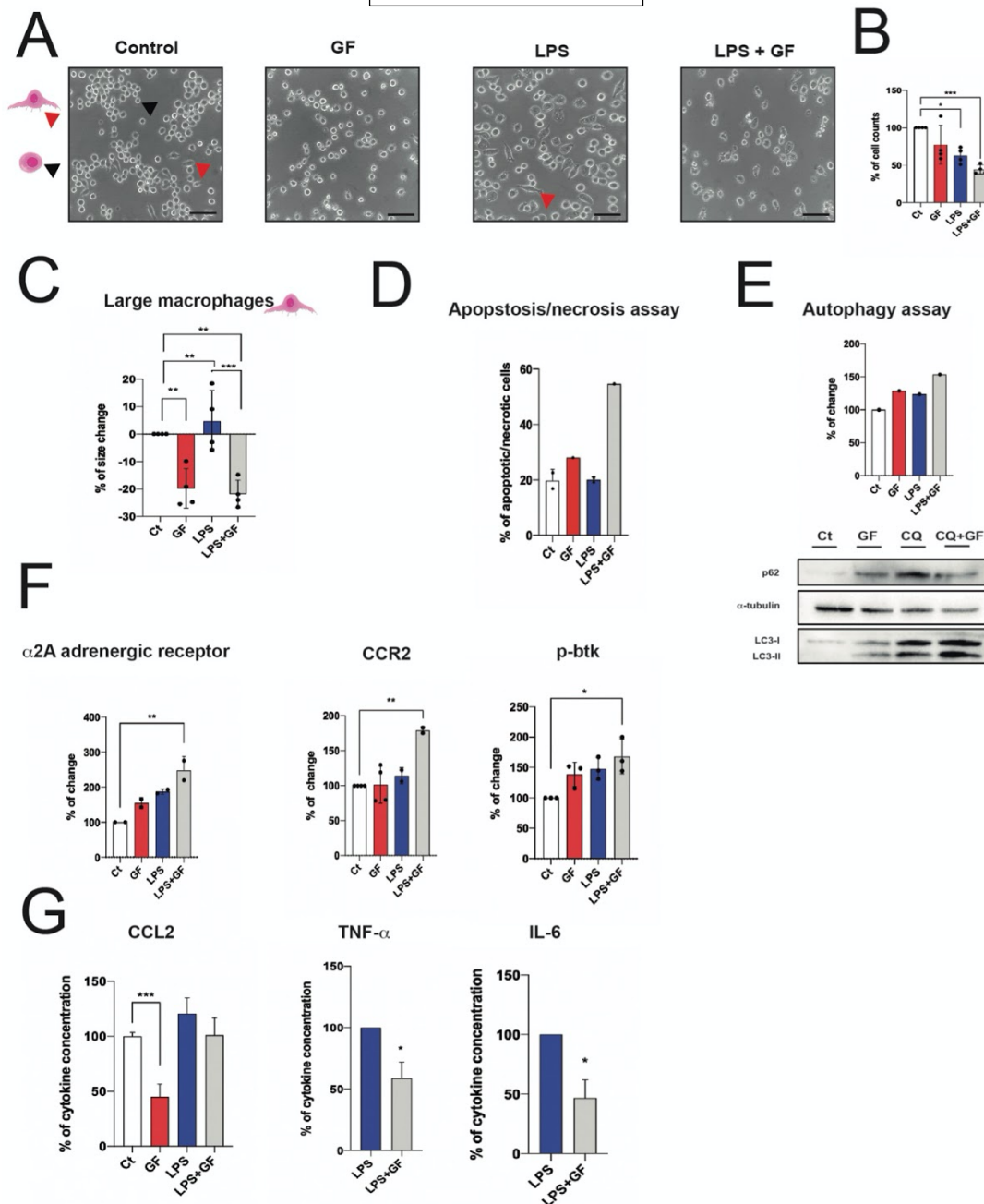


Figura 2: Análisis de resultados. **2A-** Microscopía de contraste de fases donde se observa la morfología de los macrófagos en población control, GF, LPS, y GF+LPS. **2B-** Citometría de flujo de 1 A, donde se cuantifica la reducción de macrófagos en GF + LPS. **2C-** Citometría de flujo de tamaño medio de las células grandes. **2D-** Citometría de flujo de células que cuantifica células que se encuentran en apoptosis/necrosis. **2E-** Citometría de flujo y Western Blot donde se observa que GF promueve la inhibición de la autofagia con aumento de p62 (inductor de apoptosis). **2F-** Citometría de flujo donde se observa que la combinación de GF + LPS aumenta el receptor α 2A adrenérgico, CCR2 y p-btk. **2G-** Citometría de flujo donde se observa una reducción de CCL2 y citoquinas proinflamatorias (TNF α e IL-6) tras LPS + GF.

6. DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos empleado la línea celular de monocitos/macrófagos para estudiar el papel del subtipo de receptor adrenérgico $\alpha 2A$ en el control de la inflamación mediante la modulación de las poblaciones de macrófagos. Nuestros resultados indican que la guanfacina induce la depleción de macrófagos activados previamente por LPS, promoviendo la disminución de la concentración de citoquinas pro-inflamatorias en el medio.

En la patogenia de la inflamación pulmonar en la COVID-19, los macrófagos activados por el SARS-CoV-2 juegan un papel importante fagocitando detritus celulares y células muertas y liberando citoquinas proinflamatorias como IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF)-a o IL-1b (23,24). En este sentido se ha sugerido que la depleción de macrófagos puede ser una buena estrategia para controlar la inflamación en la etapa tardía del síndrome de distrés respiratorio agudo. Existe evidencia de que la reducción de macrófagos alveolares disminuye el edema y el daño pulmonar en ratas (25,26), reduciendo la letalidad al limitar el síndrome de tormenta de citoquinas en dos modelos animales (27,28). El problema es que las estrategias disponibles para conseguir una depleción de macrófagos son limitadas. Nuestros resultados indican que el propio LPS induce apoptosis en macrófagos, como ya ha sido descrito previamente (29) (**ver Fig. 1A**). Sin embargo, el LPS causa neuro inflamación y daño cognitivo (30), además de otros efectos secundarios graves (31). Otra estrategia para conseguir la depleción de macrófagos es mediante inyecciones intraperitoneales de liposomas que contienen clodronato (CLD). El problema es que también esta estrategia tiene efectos secundarios que impiden su consideración como opción terapéutica (32). Nuestros datos indican que la guanfacina, un fármaco aprobado para su uso en el Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (33), podría ser eficaz en el control de poblaciones de macrófagos en el foco inflamatorio en inflamatorias de diferente naturaleza.

La cloroquina (CQ) es un inhibidor de autofagia que reduce la producción y liberación de IL-6 y TNF-a, posibles mediadores de las complicaciones relacionadas con las enfermedades víricas (34,35). La CQ es un compuesto ampliamente utilizado para el estudio del bloqueo de la autofagia, ya que se introduce en los lisosomas y aumenta su pH, evitando su acción catabólica. Nuestros resultados sugieren que la GF induce, del mismo modo que la CQ, la inhibición de esta ruta (**ver Fig. 2E**). Cuando esto ocurre encontramos el aumento de p62, un sustrato de la autofagia que en presencia de CQ no puede ser degradado acumulándose. Algunos autores han encontrado que la apoptosis de macrófagos puede ser inducida por esta acumulación de p62 (36), pudiendo explicar los efectos beneficiosos de bloquear con GF la autofagia en macrófagos de pacientes con COVID-19, lo que favorecería su depleción, pero que hasta donde hemos comprobado este punto aún no ha sido investigado. Nuestros resultados podrían explicar los buenos resultados que se han obtenido con otros fármacos de la misma naturaleza, como la dexmetomidina, un agonista $\alpha 2$ adrenérgico, en el tratamiento de la COVID19.

La COVID-19 está asociada con un aumento de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias que causan el síndrome de tormenta de citoquinas. Entre las más relevantes encontramos IL-6 (37), TNF- α (38) y CCL-2 (39). En macrófagos, los receptores tipo Toll reconocen la hebra monocatenaria de ARN de los virus como el SARS-CoV-2 e inician la señalización vía activación de NF- κ B dependiente de BTK, disparando la síntesis de diferentes citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (40,41). Nuestros resultados indican que la GF induce una disminución de las citoquinas IL-6, TNF- α y la quimioquina CCL-2 en el medio. Sin embargo, encontramos un aumento de p-BTK y otros marcadores de activación en las células tratadas con GF + LPS. Interpretamos que la depleción de macrófagos causada por la GF tiene como consecuencia la disminución de la concentración de citoquinas. Por otro lado, la presencia de un aumento de p-BTK podría indicar un aumento del aclaramiento de células apoptóticas por parte de los macrófagos remanentes (42,43,44). Además, nuestros resultados indican una reducción del tamaño de los macrófagos cuando tratamos con GF, lo que supone un indicador de severidad para la COVID-19, donde monocitos circulantes de mayor tamaño suponen un indicador de peor pronóstico (45).

Aún de forma preliminar nuestros resultados parecen indicar que la guanfacina actúa específicamente en macrófagos activados a través del receptor α 2a adrenérgico, induciendo la fosforilación de btk e inhibiendo autofagia. La acumulación de p62 podría inducir la apoptosis de los macrófagos, evitándose la tormenta de citoquinas (**Fig. 3**). Estos resultados preliminares permitirán, tras realizar pruebas en modelos animales de inflamación, añadir racionalidad mecánica al uso de agonistas α 2A adrenérgicos como posible herramienta terapéutica frente a la COVID-19 y otras enfermedades inflamatorias que tengan como característica la infiltración exacerbada de macrófagos.

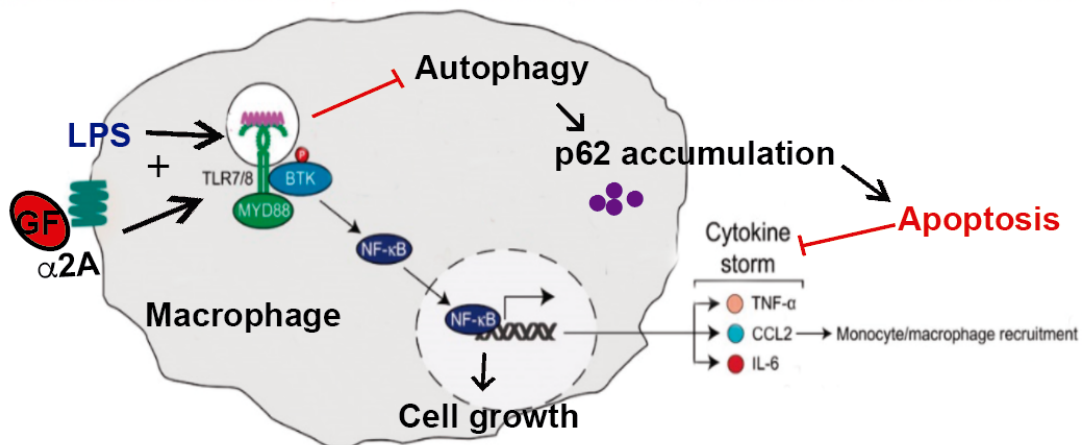


Figura 3: Resumen de funcionamiento donde la unión de GF a su receptor α 2A en presencia de LPS promueve una reacción en cascada con activación de p-BTK que inhibe a la autofagia con consecuente acumulación de p62 y este a su vez inhibe la apoptosis con reducción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 y CCL2 (reclutamiento de monocitos/macrófagos). En este contexto, el aumento de p-BTK podría indicar un aumento del tamaño celular.

7. CONCLUSIONES

- La guanfacina induce *in vitro* la depleción de macrófagos activados por LPS.
- La apoptosis de macrófagos está asociada a una mayor activación, caracterizada por la expresión de CCR2, α 2A y p-BTK.
- El tratamiento con guanfacina reduce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias de macrófagos activados *in vitro*.

8. ¿QUÉ HAS APRENDIDO?

Durante mi estancia en el laboratorio he aprendido las técnicas básicas que se emplean en este trabajo: los principios de la citometría de flujo, el western-blot y las técnicas básicas del cultivo celular. El trabajo de laboratorio exige minuciosidad, y eso creo que lo he llegado a interiorizar.

También he sido consciente de la posible utilidad clínica que puede llegar a tener este proyecto, no solo en la COVID-19, si no en un sinnúmero de patologías que tienen de nexo común la activación desmesurada y descontrolada de la inflamación, que tienen consecuencias graves para los pacientes.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. T. A. Wynn, A. Chawla, J. W. Pollard, Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*(2013), , doi:10.1038/nature12034.
2. 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.
3. 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.
4. Macrophage activation: classical versus alternative. Classen A, Lloberas J, Celada A *Methods Mol Biol.* 2009; 531():29-43.
5. Y. Chen, D. J. Klionsky, The regulation of autophagy - Unanswered questions. *J. Cell Sci.* (2011), , doi:10.1242/jcs.064576.
6. 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.
7. R. A. Saxton, D. M. Sabatini, mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* (2017), , doi:10.1016/j.cell.2017.02.004.
8. 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.
9. Machhi J, Herskovitz J, Senan AM, Dutta D, Nath B, Oleynikov MD, Blomberg WR, Meigs DD, Hasan M, Patel M, Kline P, Chang RC, Chang L, Gendelman HE, Kevadiya BD. The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2020 Sep;15(3):359-386. doi: 10.1007/s11481-020-09944-5. Epub 2020 Jul 21. PMID: 32696264; PMCID: PMC7373339.
10. 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.
11. 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.
12. Lee D.W. Gardner R. Porter D.L. et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood.* 2014; 124: 188-195
13. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, Ghobadi A, Turtle CJ, Brudno JN, Maus MV, Park JH, Mead E, Pavletic S, Go WY, Eldjerou L, Gardner RA, Frey N, Curran KJ, Peggs K, Pasquini M, DiPersio JF, van den Brink MRM, Komanduri KV, Grupp SA, Neelapu SS. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biol Blood Marrow*

- Transplant. 2019 Apr;25(4):625-638. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.12.758. Epub 2018 Dec 25. PMID: 30592986.
14. Soy M, Keser G, Atagündüz P, Tabak F, Atagündüz I, Kayhan S. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clin Rheumatol.* 2020 Jul;39(7):2085-2094. doi: 10.1007/s10067-020-05190-5. Epub 2020 May 30. PMID: 32474885; PMCID: PMC7260446.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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).
 18. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009 Jun;29(6):313-26. doi: 10.1089/jir.2008.0027. PMID: 19441883; PMCID: PMC2755091.
 19. Mohamed AJ, Yu L, Bäckesjö CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, Christensson B, Berglöf A, Vihinen M, Nore BF, Smith CI. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev.* 2009 Mar;228(1):58-73. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00741.x. PMID: 19290921.
 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. Zhang, D, Guo, R, Lei, L, et al. COVID-19 infection induces readily detectable morphological and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. *J Leukoc Biol.* 2021; 109: 13– 22.
 22. Li, X. et al. *Cell Death Dis.* (2016) doi:10.1038/cddis.2016.244.
 23. Duan, M. et al. *J. Immunol.* 189, 946–955 (2012).
 24. Herold, S., Gabrielli, N. M. & Vadasz, I. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 305, L665-81 (2013).
 25. Frank, J. A., Wray, C. M., McAuley, D. F., Schwendener, R. & Matthay, M. A. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291, L1191-8 (2006).
 26. yal, F. G., Hamm, C. R. & Parker, J. C. *Intensive Care Med.* 33, 1212–1218 (2007)
 27. Eyal, F. G., Hamm, C. R. & Parker, J. C. *Intensive Care Med.* 33, 1212–1218 (2007).
 28. Mahajan, S., Decker, C., Mellins, E. & Faccio, R. *J. Immunol.* 200, 42.18 LP-42.18 (2018).
 29. oler, C. et al. *J. Biol. Chem.* (2001) doi:10.1074/jbc.M101807200.
 30. Zhao, J. et al. *Sci. Rep.* (2019) doi:10.1038/s41598-019-42286-8.
 31. Lawrence, C. B., Brough, D. & Knight, E. M. *DMM Dis. Model. Mech.* (2012) doi:10.1242/dmm.009068.
 32. Fritz, J. M. et al. *Front. Immunol.* (2014) doi:10.3389/fimmu.2014.00587
 33. *Drug Ther. Bull.* (2016) doi:10.1136/dtb.2016.5.0402.

34. Savarino, A., Boelaert, J. R., Cassone, A., Majori, G. & Cauda, R. *Lancet. Infect. Dis.* 3, 722–727 (2003).
35. Jang, C.-H., Choi, J.-H., Byun, M.-S. & Jue, D.-M. *Rheumatology (Oxford)*. 45, 703–710 (2006).
36. Li, X. et al. *Cell Death Dis.* (2016) doi:10.1038/cddis.2016.244.
37. Chen LYC, Hoiland RL, Stukas S, Wellington CL, Sekhon MS. Assessing the importance of interleukin-6 in COVID-19. *Lancet Respir Med.* 2021 Feb;9(2):e13. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30600-7. Epub 2021 Jan 15. PMID: 33460569; PMCID: PMC7836242
38. Robinson PC, Liew DFL, Liew JW, Monaco C, Richards D, Shivakumar S, Tanner HL, Feldmann M. The Potential for Repurposing Anti-TNF as a Therapy for the Treatment of COVID-19. *Med (N Y)*. 2020 Dec 18;1(1):90-102. doi: 10.1016/j.medj.2020.11.005. Epub 2020 Dec 3. PMID: 33294881; PMCID:
39. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020 Feb 15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5. Epub 2020 Jan 24. Erratum in: *Lancet.* 2020 Jan 30;; PMID: 31986264; PMCID: PMC7159299.
40. M. Tatematsu, F. Nishikawa, T. Seya, M. Matsumoto, Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat. Commun.* 4, 1833 (2013)
41. M. Feng, J. Y. Chen, R. Weissman-Tsukamoto, J. P. Volkmer, P. Y. Ho, K. M. McKenna, S. Cheshier, M. Zhang, N. Guo, P. Gip, S. S. Mitra, I. L. Weissman, Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: Roles of TLR and Btk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 2145–2150 (2015).
42. Bruton's Tyrosine Kinase Is Required for Apoptotic Cell Uptake via Regulating the Phosphorylation and Localization of Calreticulin
43. Jennifer C. Byrne, Joan Ní Gabhann, Kevin B. Stacey, Barbara M. Coffey, Eoghan McCarthy, Warren Thomas, Caroline A. Jefferies
44. *The Journal of Immunology* May 15, 2013, 190 (10) 5207-5215; DOI: 10.4049/jimmunol.1300057
45. Zhang, D, Guo, R, Lei, L, et al. COVID-19 infection induces readily detectable morphological and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. *J Leukoc Biol.* 2021; 109: 13– 22.