

Inflamació i macròfags

Jorge Lloberas i Antonio Celada

Grup de Biologia del Macròfag, Departament de Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Adreça per a la correspondència: Jorge Lloberas, Antonio Celada. Parc Científic de Barcelona. C. de Baldiri i Reixac, 10. 08028 Barcelona. Adreça electrònica: jlloberas@ub.edu, acelada@ub.edu.

DOI: 10.2436/20.1501.02.143
ISSN (ed. impresa): 0212-3037
ISSN (electrònic): 2013-9802
<http://revistes.iec.cat/index.php/TSCB>
Rebut: 02/02/2014 Acceptat: 15/03/2014

Resum

Els macròfags tenen un paper clau en la inflamació. Durant l'inici del procés inflamatori aquestes cèl·lules s'activen i mostren una potent funció fagocítica i microbicida que pot tenir efectes destructius en els teixits on actua. L'activació dels macròfags implica la inducció de més de quatre-cents gens, i dona com a resultat més capacitat per eliminar els bacteris i per regular moltes altres cèl·lules a través de l'alliberament de citocines i quimiocines. L'activació excessiva d'aquestes cèl·lules té efectes perjudicials, com ara el xoc sèptic, que pot conduir a la síndrome de disfunció orgànica múltiple i a la mort. En altres situacions la persistència dels resultats de l'activitat proinflamatòria pot contribuir al desenvolupament de processos d'inflamació crònica, com l'artritis reumatoide, la psoriasi i la malaltia inflammatòria de l'intestí. Per evitar aquests efectes indesitjables els macròfags han desenvolupat diversos mecanismes per regular l'excés d'activació, de manera que es condueix a la desactivació dels macròfags i a la resolució de la inflamació.

Paraules clau: macròfag, interferó g, inflamació, activació dels macròfags, desactivació dels macròfags.

Introducció

Els monòcits/macròfags tenen funcions essencials en l'homeòstasi, la infecció, la reparació de teixits i la resolució de la inflamació (Celada i Nathan, 1994). Els macròfags participen en la resposta immunitària innata i adquirida. Aquestes cèl·lules tenen funcions pleiotròpiques al cos i no només tenen un paper clau en el sistema immunitari, sinó que també són crítiques per a l'homeòstasi de nombrosos sistemes metabòlics. Per exemple, els eritròcits vells presenten alteracions en la seva membrana que són reconegudes pels macròfags i les utilitzen per fagocitar i eliminar aquestes cèl·lules velles. En fer això, els macròfags obtenen ferro de l'hemoglobina i són capaços d'alliberar-lo en un lloc i moment posterior en funció de les necessitats del cos. Per tant, el metabolisme del ferro és principalment controlat pels macròfags. El macròfag intervé en moltes altres funcions que es resumeixen en la figura 1.

Proliferació

Els monòcits s'originen a partir de les cèl·lules mare hematopoètiques del moll d'os en resposta a factors de creixement específics com ara el factor estimulador de colònies de macròfags (M-CSF), la interleucina-3 (IL-3) i del factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF). Aquests factors regulen l'expressió d'una sèrie de factors de transcripció que induïxen o reprimeixen una sèrie de gens que a la vegada promouen la diferenciació dels macròfags (Valledor *et al.*, 1998) en una sèrie d'etapes ben defi-

Inflammation and macrophages

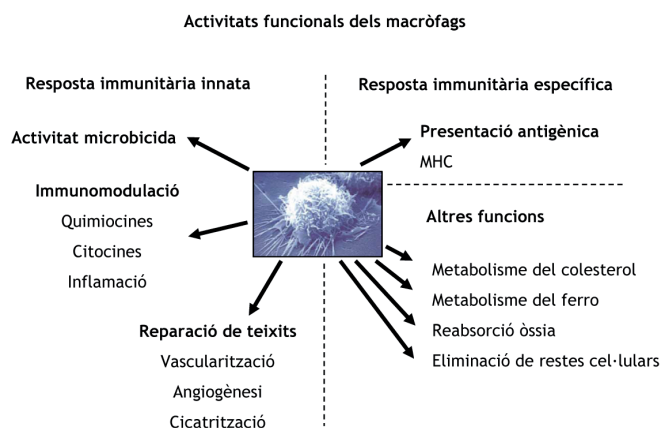
Summary

Macrophages play key roles in inflammation. During the onset of the inflammatory process, these phagocytic cells become activated and have destructive effects. Macrophage activation, which involves the induction of more than 400 genes, results in an increased capacity to eliminate bacteria and to regulate many other cells through the release of cytokines and chemokines. However, excessive activation has damaging effects, such as septic shock, which can lead to multiple organ dysfunction syndrome and death. In other situations, persistence of pro-inflammatory activity results in the development of chronic inflammation, such as rheumatoid arthritis, psoriasis and inflammatory bowel disease. To prevent undesirable effects, several mechanisms have evolved to control excess activation, thereby leading to macrophage deactivation and the resolution of inflammation. In this review we will discuss the molecular mechanisms of proliferation, activation and survival of macrophages.

Key words: macrophage, interferon gamma, inflammation, macrophage activation, macrophage deactivation.

nides (Celada *et al.*, 2002). Entre aquests factors de transcripció, PU.1 té un paper crític (Lloberas *et al.*, 1999a). PU.1 induïx l'expressió del receptor de M-CSF, i incrementa així la proliferació (Celada *et al.*, 1996a). La proliferació està influïda positivament per factors com el factor de creixement transformant (*transforming growth factor*, TGF- α), que actua coordinadament sobre altres factors de creixement (Celada i Maki, 1992). Els glucocorticoides induïxen la producció autocrina de M-CSF dels macròfags i incrementa així la proliferació (Lloberas *et al.*, 1998). L'adenosina té un efecte negatiu sobre la proliferació, després d'unir-se al receptor A2B genera AMPc i induïx l'expressió de p27^{kip-1}, que és un inhibidor del cicle cel·lular (Xaus *et al.*, 1999a). Hem explorat la via de senyalització dels factors de creixement i demostrat que la calcineurina no té cap paper en la proliferació (Comalada *et al.*, 2003a). No obstant això, l'activitat isomerasa de les immunofilines té un efecte clau sobre la proliferació, i incrementa l'activació de la via Raf-1/MEK/ERK (Sanchez-Tilló *et al.*, 2006a). Els inhibidors de les immunofilines fan que les cèl·lules s'aturin en la fase G1 del cicle cel·lular a través de la inactivació de la ciclina dependent de la cinasa2 (Cdk2), sense afectar-ne la viabilitat. El receptor nuclear del fetge X (LXR) inhibeix la proliferació dels macròfags dependents de l'M-CSF, que s'acumulen en la interfase G0/G1 del cicle cel·lular (Pascual-García *et al.*, 2011). LXR induïx una inhibició de l'expressió de molècules necessàries per a la progressió del cicle cel·lular, com són les ciclines D1, B1 i les cinases dependents de les ciclines 2 i 4.

Després de la maduració els monòcits arriben a tots els teixits del cos a



↑ **Figura 1.** Diferents funcions en les quals participen els macròfags.

través del sistema circulatori. En resposta als factors de creixement i citocines (incloent-hi GM-CSF, IL-4 i TGF- α) amb els quals interaccionen, els monòcits poden proliferar i diferenciar-se a tipus cel·lulars específics depenent del teixit: en general a macròfags residents, en el cervell a microglia, en l'os als osteoclasts, en el fetge a les cèl·lules de Kupffer, en la pell a les cèl·lules de Langerhans, en l'os a macròfags de la medulla òssia i en l'intestí a macròfags de cripta, i activar-se i desenvolupar les seves funcions. A més, els macròfags poden convertir-se en cèl·lules escumoses, que tenen un paper crític en l'arteriosclerosi i el metabolisme del colesterol (Valledor *et al.*, 2010a, 2010b).

Activació

Sota l'efecte d'una sèrie de citocines i molècules provinents de la paret bacteriana com el lipopolisacàrid (LPS) els macròfags pateixen una sèrie de modificacions morfològiques, bioquímiques i gèniques, que en conjunt anomenem *activació* i que suposen la capacitat de desenvolupar una sèrie d'activitats funcionals. Una de les activitats dels macròfags és el que anomenem *presentació antigènica*. Aquesta activitat consisteix a captar partícules estranyes (per exemple, gèrmens) i degradar-ne les proteïnes. Si la configuració dels fragments (pèptids) és l'adequada aquests es carreguen dins de la forquilla del complex principal d'histocompatibilitat de classe II (MHC II) i són exposats a la superfície de la cèl·lula. Si troben el limfòcit T amb el receptor adequat (TCR) s'activarà i produirà citocines, que provoquen que la resposta immunitària adaptativa s'expandeixi. Aquest fenomen és el que caracteritza els macròfags com a cèl·lula presentadora d'antigen professional.

Un dels nostres objectius ha estat determinar el mecanisme d'expressió dels gens de l'MHC II provocada per l'IFN- γ (Celada, 1996; Lloberas *et al.*, 1999b). La regulació d'aquests gens es fa a escala transcripcional, a escala traduccional i també de la vida mitjana de la proteïna (Cullell-Young *et al.*, 2001). Mentre que l'RNA de l'MHC de classe II després de 24 h de tractament amb IFN- γ augmenta set cops, els nivells de transcripció ho fan 2,5 vegades, i això suggereix un bloqueig al nivell de la traducció. L'IFN- γ indueix un increment de la síntesi proteica de sis vegades en induir la traducció. La vida mitjana de les proteïnes està augmentada per l'efecte de l'IFN- γ . Per tant, aquesta citocina actua a tots els nivells per incrementar l'expressió de les molècules de l'MHC de classe II.

El promotor de tots els gens de l'MHC de classe II en totes les seves variants i en les diferents espècies conté unes seqüències conservades que s'anomenen X, Y i S, separades per vint parells de bases, cosa que fa que estiguin en la mateixa orientació. A aquestes caixes s'uneixen factors de transcripció que estan de manera ubiqüa en totes les cèl·lules. El que dóna l'especificitat cel·lu-

lar és l'expressió del transactivador CIITA que induïx l'IFN- γ en macròfags i cèl·lules dendrítiques, mentre que en limfòcits B s'expressa constitutivament.

Hem determinat que el factor que s'uneix a la caixa Y és un dímer format pels factors NF-YA i NF-YB (Celada *et al.*, 1996b). Tots dos factors són necessaris per a una unió eficaç al DNA. A més, hem identificat el factor que s'uneix a la caixa S i l'hem purificat parcialment (Celada *et al.*, 1996c).

La regió més propera del promotor dels gens de l'MHC II, i en especial les tres caixes conservades (X, Y i S), són fonamentals per a la regulació de la transcripció. Un segon conjunt de seqüències conservades està present aproximadament 1.200-1.500 pb en direcció 3' i en orientació oposada (caixes distals). La mutació de les caixes distals augmenta l'acció induïda per l'IFN- γ en els macròfags i en els limfòcits B tractats, cosa que suggereix un efecte repressiu sobre la transcripció (Serrat *et al.*, 2010). *In vitro*, en experiments de tractament amb ligasa T4, els extrems proximal i distal del promotor del gen *IA β* es van lligar en presència d'extractes nuclears de macròfags no tractats, però no ho van fer quan es van tractar amb els extractes de macròfags estimulats amb IFN- γ . La mutació de caixes distals o proximals dóna una disminució en l'assaig de lligació. L'addició de CIITA recombinant a extractes nuclears provinents de macròfags no tractats amb IFN- γ va reduir la capacitat del promotor per ser lligat (vegeu la figura 2).

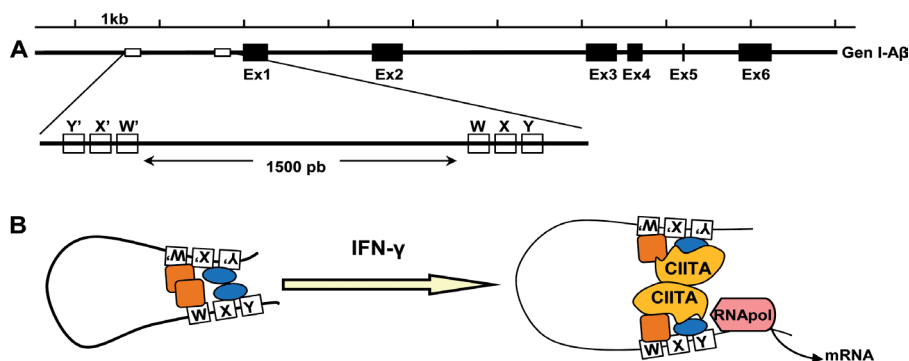
Finalment, es va observar un augment de la capacitat per lligació del promotor en els extractes provinents de limfòcits B que no tenen CIITA, però no a partir de limfòcits B que no tenen RFXANK. Aquests resultats ens permeten postular un model en què les proteïnes agrupades en les seqüències proximal i distal conservades interaccionen. Quan s'indueix CIITA, aquestes proteïnes creen un *enhanceosome* (amplificador), cosa que permet que la cromatina es descompacti i iniciï la transcripció.

Utilitzant gradients de polisomes hem vist que l'IFN- γ induïx un augment de la quantitat de RNA de l'MHC de classe II que s'uneix als ribosomes, i això indica que aquesta citocina no només induïx l'expressió de l'RNA a escala transcripcional, sinó que a més ho induïx pel que fa a la traducció, i augmenta així la taxa de síntesi de proteïnes (Goñalons *et al.*, 1998).

En els limfòcits B, l'LPS induïx la transcripció de l'RNA de l'MHC de classe II, i a més incrementa la traducció (Barrachina *et al.*, 1999). L'LPS incrementa l'expressió de l'mRNA en les cèl·lules dendrítiques i a escala transcripcional en els limfòcits B. Això no ho fa incrementant els nivells del transactivador CIITA, sinó directament induïnt un complex AP-1, que s'uneix a una seqüència situada a unes -1.700 pb en el promotor (Casals *et al.*, 2007). El tractament amb IFN- γ fa que els macròfags aturin el cicle cel·lular en la interfase G1, i es bloca a escala transcripcional l'expressió dels gens de l'MHC de classe II sense modificar els nivells del transactivador CIITA (Xaus *et al.*, 2000a).

També ens hem interessat pels mecanismes de repressió de la regulació de l'expressió dels gens de l'MHC de classe II (Lloberas *et al.*, 1997). El factor de transcripció PU.1 inhibeix activament l'expressió d'*IA β* a través de la unió a una seqüència de DNA prop de la caixa Y, un element *cis* en el promotor necessari per a la transcripció. Aquesta interacció probablement interfereix amb el conjunt del complex de preiniciació (Borràs *et al.*, 1995). NF-Y és un factor de transcripció que s'uneix a la caixa Y i té dos components: NF-YA (que s'uneix feblement al DNA) i NF-YB (que augmenta la unió de NF-YA al DNA). La proteïna dbpA reprimeix l'expressió d'*IA β* per un mecanisme de bloqueig, i forma un complex amb NF-YA i la proteïna dbpB per segrest de la proteïna NF-YB (Lloberas *et al.*, 1995).

Un mecanisme similar s'observa amb el receptor de glucocorticoides que s'uneix a les proteïnes que formen part de la caixa X i n'inhibeix la interacció (Celada *et al.*, 1993). Aquests resultats són exemples de la interacció entre les proteïnes, que poden ajudar a entendre la regulació de l'expressió del gen



† Figura 2. Representació esquemàtica de la formació del llaç en absència de CIITA. Quan el transactivador és present, el bucle és obert, i d'aquesta manera permet la transcripció (Serrat *et al.*, 2010).

IA β. En els macròfags hem descrit la presència dels receptors A2B d'adenosina. L'IFN-γ induïx l'expressió d'aquests receptors, que quan interaccionen amb el lligand induïxen una repressió de l'expressió dels gens de l'MHC de classe II, i es demostra com un mecanisme d'autoregulació per a la desactivació dels macròfags (Xaus *et al.*, 1999b).

Altres gens induïts per l'IFN-γ, com el transportador associat al processament antigènic (Tap)-1 i el pèptid de baix pes molecular (LMP)-2, són crucials per a la funcionalitat de les proteïnes del complex de l'MHC de classe I i comparteixen un promotor bidireccional comú. La inducció promoguda per l'IFN-γ és independent de la síntesi gènica immediata i tant STAT1 com IRF-1 són necessaris per a la inducció per IFN-γ de TAP-1 i LMP-2 (Bruceat *et al.*, 2004).

Cal assenyalar que tant l'activació dels macròfags per LPS o TNF-α induïx Tap1 i LMP2 i es requereix la participació de STAT1. Això s'explica per la producció autocrina de factors com els interferons de tipus I, que són els que actuen induïnt Tap1 i LMP2 (Marques *et al.*, 2004).

IFN-γ és el principal activador de tipus Th1 endogen de macròfags. La via clàssica de senyalització induïda per l'IFN-γ implica l'activació de STAT-1. No obstant això, l'IFN-γ té també la capacitat d'activar els membres de la família MAPK. Hem observat una forta activació de p38 en els punts de temps inicials de l'estimulació per IFN-γ, mentre que l'activació feble de ERK-1/2 i JNK-1 es va detectar en una etapa més tardana (Valledor *et al.*, 2008). p38 participa principalment en la regulació de l'expressió de gens necessaris per a la resposta immunitària innata, incloent-hi quimiocines com ara CCL5, CXCL9 i CXCL10; citocines com TNF-α, i la NO-sintasa induïble, mentre que JNK-1 actua sobre els gens involucrats en presentació antigènica, incloent-hi CIITA i els gens que codifiquen molècules de l'MHC de classe II.

Els macròfags tenen la capacitat de reconèixer nanopartícules d'or (NP) conjugades a pèptids com el pèptid amiloide inhibidor del creixement (AGIP) i el *sweet arrow peptide* (SAP), mentre que no reconeixen pèptids o NP sense conjuguar (Bastús *et al.*, 2009a, 2009b). El reconeixement d'aquests conjugats fet pels macròfags depèn d'un receptor de reconeixement de patrons moleculars, el TLR-4. Així doncs, quan els macròfags són exposats als pèptids conjugats a Au-NP s'indueixen les citocines proinflamàtores, com ara el TNF-α, IL-1β i IL-6, així com la sintasa d'òxid nítric, i s'atura la capacitat proliferativa dels macròfags. Aquests resultats obren un nou camí en el món dels adjuvants i il·lustren els requisits bàsics per al disseny de conjugats amb NP que arribin eficaçment al seu objectiu.

La proteïna decorina de la matriu extracel·lular, de manera similar a com ho fa el principal activador dels macròfags com és l'IFN-γ, amplifica l'expressió dels gens de l'MHC de classe II induïda per l'IFN-γ. A més, augmenta l'expressió induïda dels gens de la NO-sintasa, TNF-α, IL-1β i IL-6 promo-

guda per l'IFN-γ o l'LPS i la secreció d'aquestes citocines. La decorina suprimeix la unió de TGF-β als macròfags. L'augment en l'activació desfermada per la decorina demostra que els macròfags estan sota la regulació negativa, que pot ser revertida per les proteïnes de la matriu extracel·lular (Comalada *et al.*, 2003a, 2003b).

L'activació bloqueja la proliferació: paper de la fosfatasa MKP-1

Una gran diferència entre les cèl·lules de la immunitat innata i l'adquirida és el seu comportament quan s'activen. Els limfòcits, quan reconeixen alguna cosa com a estranya a través del TCR o del BCR, el primer que fan és proliferar (expansió clonal) i després dur a terme les seves funcions, com la producció de citocines o immunoglobulines. Els macròfags quan proliferen si reben senyals d'activació, com l'IFN-γ o LPS, bloquegen la proliferació i s'activen (Xaus *et al.*, 2001a, 2001b).

Curiosament, tant els senyals de proliferació induïts per M-CSF com els d'activació produïts per LPS requereixen la fosforilació de l'*external regulated kinase* (ERK) (Valledor *et al.*, 2000a). La proliferació de macròfags requereix un curt període de fosforilació d'ERK, mentre que es requereix un període prolongat per a l'activació dels macròfags. La duració de la fosforilació és controlada per la MAPK-fosfatasa-1 (MKP-1), una fosfatasa de localització nuclear i d'especificitat dual que desfosforila les MAPK, ERK, p38 i c-Jun NH (2)-cinas terminal (JNK). MKP-1 és induïda en macròfags per factors de creixement, així com pels activadors com ara LPS, però amb diferents cinètiques, per assolir els diferents resultats funcionals (en comparació amb l'activació de la proliferació) (Comalada *et al.*, 2012). Aquesta fosfatasa és la clau que controla el pas entre la proliferació i l'activació dels macròfags.

També hem analitzat els mecanismes d'inducció de la MKP-1. Mentre que en altres tipus cel·lulars l'activació d'ERK induïx l'expressió de MKP-1, en els macròfags són fets independents (Valledor *et al.*, 1999; 2000a). La isoforma ε de la proteïna cinasa C (PKC) és necessària per a la inducció de MKP-1 tant per estímuls de proliferació (Valledor *et al.*, 1999), com d'activació (Valledor *et al.*, 2000b).

A més, l'expressió de *mkp-1* en els macròfags requereix l'activació de Raf-1 i aquesta activació segueix les diferents cinètiques d'inducció d'MKP-1 en resposta a l'M-CSF o l'LPS en aquestes cèl·lules (Sánchez-Tilló *et al.*, 2006b). L'expressió de *mkp-1* en macròfags també està intervinguda per l'activació de la isoforma JNK-1 (Sánchez-Tilló *et al.*, 2007). Igual que molts altres gens d'expressió immediata, l'expressió de *mkp-1* està regulada principalment a escala transcripcional. En els macròfags es requereix una seqüència amb una caixa per al reclutament de CREB/AP-1 a la regió promotora del gen de *mkp-1*, per poder induir el gen per a l'estímul de l'M-CSF o de l'LPS (Casals *et al.*, 2009). Però l'estimulació a través d'aquesta regió va ser induïda en diferents moments després de l'activació amb els dos estímuls: primer per CREB i després per c-Jun.

Aquests factors de transcripció són els responsables d'aquesta inducció de MKP-1 amb l'expressió de c-Jun per M-CSF o LPS amb correlació amb les diferents cinètiques de MKP-1 induïda per M-CSF i LPS. L'estimulació dels macròfags amb IFN-γ perllonga el patró d'activitat d'ERK induïda per M-CSF en els macròfags. Aquests efectes es correlacionen amb la inhibició provocada per IFN-γ, en activar l'expressió de diversos membres de la família MAPK-fosfatasa, a saber, MKP-1, 2, i 4. D'altra banda, la inhibició de l'expressió de MKP-1 utilitzant la tecnologia dels siRNA o inhibidors sintètics també va provocar l'allargament de l'activitat d'ERK i el bloqueig significatiu de la proliferació dependent de M-CSF. Per tant, els canvis subtils en el transcurs del

temps d'activitat dels membres de la família MAPK contribueixen als efectes antiproliferatius d'IFN- γ en els macròfags (Valledor *et al.*, 2008).

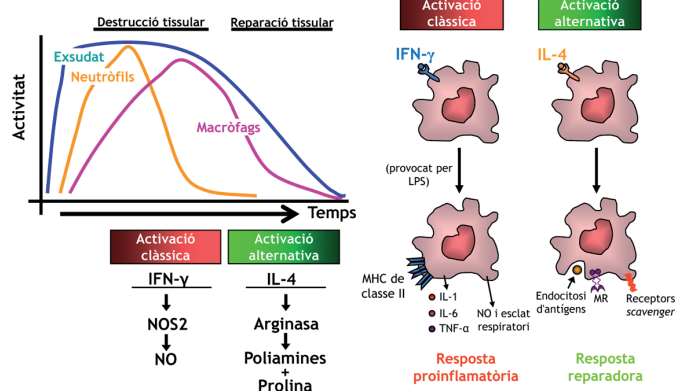
Cal assenyalar que la proliferació i l'activació dels macròfags també depenen de diferents sistemes de transport de nucleòsids. Els nucleòsids necessaris per a la síntesi de DNA i RNA són reclutats des del medi extracel·lular. L'M-CSF induïx la proliferació dels macròfags i la síntesi de DNA i RNA, mentre que l'IFN- γ provoca l'activació, bloqueja la proliferació i només induïx la síntesi de RNA. Els macròfags expressen els sistemes concentratius N1 i N2 (corresponents als gens *cnt1* i *cnt2*) i els sistemes equilibratius ES i EI (corresponents als gens *ent1* i *ent2*). La incubació amb M-CSF només provoca la sobreexpressió del sistema equilibrador ES. La inhibició d'aquest sistema de transport bloqueja la proliferació dependent de M-CSF. D'altra banda, el tractament amb IFN- γ induïx només els sistemes de N1 i N2 i també reprimeix l'augment de l'expressió del sistema equilibrador ES induïda per l'M-CSF. Per tant, la proliferació i l'activació dels macròfags requereixen una regulació selectiva dels transportadors de nucleòsids i poden respondre als requisits específics per a la síntesi de DNA i RNA (Soler *et al.*, 2001). Les dues vies STAT1, tant dependents com independents, estan involucrades en la regulació dels transportadors de nucleòsids de l'IFN- γ en els macròfags (Soler *et al.*, 2003).

Activació clàssica (proinflamatòria o M1) i alternativa (antiinflamatòria o M2)

La inflamació és la resposta del sistema immunitari a tot tipus de lesions (infeccions, agents físics o químics, traumes, etc.). L'objectiu és eliminar tots els materials «no propis» i reparar el dany. Recentment, s'ha detectat un component inflamatori en un gran nombre de malalties cròniques com el càncer, la malaltia metabòlica, d'autoimmunitat, etc. Durant la primera etapa de la inflamació hi ha una vasodilatació local i exsudació. Les cèl·lules endotelials expressen la selectina E i els neutròfils arriben als locus inflamatoris. Després de 24 h la cèl·lula endotelial substitueix l'expressió de la selectina E per ICAM-1 i només passen els monòcits de la circulació als teixits. Finalment, depenent de la intensitat de la inflamació, l'endoteli expressa V-CAM1, que dóna peu a l'extravasació dels limfòcits T activats. En els teixits els monòcits es converteixen en macròfags. Durant els passos inicials aquestes cèl·lules mostren una activitat proinflamatòria (M1 o activació clàssica), destrueixen els microorganismes restants, que no han estat eliminats pels neutròfils, i fagociten els cossos apoptòtics de neutròfils i les cèl·lules danyades en els teixits (Valledor *et al.*, 2010b). Després d'aquesta fase proinflamatòria el fenotip dels macròfags canvia i els teixits es reparen. Aquests macròfags antiinflamatoris, també anomenats M2 o *activats alternativament*, induïxen el procés de cicatrització del teixit malmès (Xaus *et al.*, 2001a). En condicions fisiològiques hi ha un equilibri entre les fases proinflamatòria i antiinflamatòria, ja que un excés de proinflamació podria ser la base per a una inflamació crònica posterior, mentre que un excés d'antiinflamació pot produir un excés de fibrosi. L'excés tant d'una com de l'altra desenvoluparà processos patològics. Per tant, el paper dels macròfags en la inflamació és fonamental (vegeu la figura 3).

A més d'una sèrie de modificacions estructurals i funcionals, una diferència essencial entre els fenotips dels macròfags activats clàssicament o alternativament és la via bioquímica utilitzada per al processament de l'aminoàcid arginina. L'IFN- γ o l'LPS induïxen l'enzim NOS2, que produirà òxid nítric (NO) a partir de l'arginina, amb gran poder destructiu, que en les primeres fases de la inflamació serà capaç de matar els microorganismes. En els macròfags M2 s'indueix l'arginasa i produeix prolina i poliamines, que catalitzen la reconstitució de la matriu extracel·lular danyada, cosa que té lloc durant les últimes fases de la inflamació. L'entrada de l'arginina dins del macròfag es produeix a través de transportadors específics. Hem vist que l'activació clàssica i alternativa dels macròfags induïx l'expressió del sistema

El procés inflamatori: el doble paper dels macròfags



† Figura 3. La integració dels macròfags dins del procés inflamatori és essencial. El paper que desenvolupen l'activació clàssica i l'alternativa és un equilibri regulat de manera exquisida en el temps.

de transport CAT2 per millorar l'entrada d'arginina (Yeremian *et al.*, 2006a; 2006b; Martín *et al.*, 2006). Aquest sistema de transport limita l'activació dels macròfags. Hem trobat que la IL-4 bloqueja la proliferació dels macròfags en la fase G1/S i que està mitjançada per p21^{waf1} i depèn de STAT6 (Arpa *et al.*, 2009) (vegeu la figura 3).

En col·laboració amb el grup de recerca d'Ingrid Muller (Imperial College de Londres) i Manuel Modolell (Max Planck de Friburg), hem vist que la susceptibilitat a *Leishmania* es correlaciona amb la producció de l'arginasa i de les poliamines, que són requerits pels paràsits per créixer (Kropf *et al.*, 2005). Una mutació en el promotor CAT2 en una soca de ratolins produeix un transport deficient d'arginina en els macròfags que es correlaciona *in vitro* amb un deteriorament de l'activació dels macròfags i una disminució del creixement de la inflamació induïda per la *Leishmania* (Sans-Fons *et al.*, 2013). Tots aquests resultats demostren que un dels factors que controlen la resposta immunitària és la disponibilitat per a la captació d'arginina a partir del medi.

La quantitat d'arginina disponible en els locus inflamatoris és un factor limitant per al creixement de diverses cèl·lules del sistema immunitari. L'activació induïda per la IL-4 als macròfags provoca la síntesi de l'arginasa-1, que converteix l'arginina en ornitina, un precursor de poliamines i de prolina. La tricostatina A (TSA), un inhibidor de desacetilases d'histones (HDAC), inhibeix l'expressió de l'arginasa-1 induïda per la IL-4. La TSA provoca efectes directes en el promotor dels gens que responen a l'activació induïda per la IL-4. Mentre que la TSA inhibeix l'expressió de l'arginasa-1, *fizz* i *mrc1*, altres gens, com ara *ym1*, *mgl1* i *mgl2*, no es van veure afectats. La inhibició de l'arginasa-1 es va produir en el nivell transcripcional amb la inhibició de la unió de la polimerasa II al promotor. IL-4 induïx la fosforilació de STAT6 i la unió al DNA. Aquestes activitats no es van veure afectades pel tractament de TSA. Malgrat això, la TSA inhibeix la unió al DNA de C/EBP β . Aquest inhibidor induïx acetilació dels residus de lisina 215-216, que són crítics per a la unió al DNA. Aquests resultats demostren que l'equilibri d'acetilació/desacetilació influeix fortament en l'expressió de l'arginasa-1, un gen de l'activació alternativa dels macròfags (Serrat *et al.*, 2012).

L'activació dels macròfags, que implica la inducció de més de quatre-cents gens, dóna com a resultat un augment de la capacitat per eliminar els bacteris i per regular moltes altres cèl·lules a través de l'alliberament de citocines i quimiocines. No obstant això, l'activació excessiva té efectes perjudicials, com ara xoc sèptic, que pot conduir a la síndrome de disfunció orgànica múltiple i la mort. En altres situacions la persistència de l'activitat proinflamatòria pro-

ta al desenvolupament de la inflamació crònica, com l'artritis reumatoide, la psoriasis i la malaltia inflamatòria de l'intestí. Per evitar efectes indesitjables, diversos mecanismes han evolucionat per controlar l'excés d'activació, cosa que condueix a la desactivació dels macròfags i la resolució de la inflamació (Valledor *et al.*, 2010b).

Activació proinflamatòria i supervivència

Durant l'activació proinflamatòria dels macròfags mitjançada per IFN- γ o LPS es produeix un augment en la capacitat d'eliminar bacteris i de regular altres cèl·lules a través de l'alliberament de citocines. També es produeixen molts productes que són tòxics per als microorganismes, com l'òxid nítric (NO), espècies reactives d'oxigen (ROS), TNF- α , etc., que a la vegada també són tòxics per als macròfags.

Els nostres treballs han aportat proves que l'LPS induïx l'apoptosi en els macròfags a través de la producció autocrina de TNF- α i en menys mesura a través de la producció d'òxid nítric (Xaus *et al.*, 2000b). L'LPS activa el macròfag a través de PKC- ϵ per iniciar la inducció de la JNK per donar la síntesi de TNF- α (Comalada *et al.*, 2003c). Els macròfags, per protegir-se, han desenvolupat mecanismes com la inducció per IFN- γ de l'inhibidor de CDK p21^{waf-1}, que bloqueja la inducció de l'apoptosi (Xaus *et al.*, 1999c). És important destacar que l'IFN- γ és capaç de bloquejar l'efecte apoptòtic de l'LPS malgrat la producció de TNF- α . En les biòpsies dels pacients amb sarcoidosi, el nostre model de malaltia granulomatosa amb persistència de macròfags en les lesions, hem detectat un augment de l'expressió d'IFN- γ i de p21^{waf-1} però no d'altres gens antiapoptòtics (Xaus *et al.*, 2003). L'M-CSF induïx la proliferació i la protecció contra l'apoptosi mitjançant dues vies diferents. Actua a través de la via ERK per a la proliferació, mentre que per a la protecció de l'apoptosi s'activa Akt i la PI-3-cinasa, que induïx p21^{waf-1} (Comalada *et al.*, 2004). Aquest inhibidor de CDK també controla la producció excessiva de TNF- α (Lloberas i Celada, 2009).

Els esdeveniments de senyalització que segueixen a la interacció d'una cèl·lula amb la matriu extracel·lular en poden afectar el comportament. En presència de M-CSF i decorina, que és un proteoglicà de la matriu extracel·lular, els macròfags expressen p27^{kip}, que bloqueja la proliferació i expressa p21^{waf-1}, que els protegeix de la inducció de l'apoptosi (Xaus *et al.*, 2001b). A més, la decorina bloqueja el receptor del TGF- β i augmenta l'activació (Comalada *et al.*, 2003c). Per tant, quan els macròfags arriben al focus inflamatori hi ha una sèrie de mecanismes que els ajuden a sobreviure a escala local i els permeten activar-se i dur a terme les seves funcions. Finalment, p38 α limita la inflamació aguda a través de l'activació de l'expressió de gens antiinflamatoris dependent de mitògens i cinases activades per estrès (Kim *et al.*, 2008).

Un dels mecanismes utilitzats pels macròfags per sobreviure a l'activació induïda per IFN- γ és TREX1. Aquesta proteïna és una 3' \rightarrow 5' exonucleasa del DNA, és la més abundant en mamífers que mostra especificitat per l'ssDNA. Hem demostrat que l'activitat exonucleasa de TREX1 té preferències d'unió a determinades seqüències de DNA (Brucet *et al.*, 2007). Per esbrinar com es produeix la discriminació es va determinar l'estructura cristal·lina de TREX1. Quan s'activen els macròfags TREX1 es transposa al nucli, però primer ha de perdre un segment C-terminal per fer-ho. A través d'una regió

rica en prolina en la superfície TREX1 interactua amb proteïnes que contenen el domini WW2. Aquestes observacions suggereixen que TREX1 participa en més complexos funcionals del que es pensava. TREX1 pertany a la família DEDDh-exonucleases, els seus membres presenten baixos nivells d'identitat de seqüència però posseeixen una estructura i un centre actiu similars. Es demostra que el liti i el sodi inhibeixen l'activitat exonucleolítica de TREX1 mitjançant la inducció de reordenaments subtils en el centre actiu. La nostra anàlisi també va revelar que un residu d'histidina (His124), altament conservat en la família DEDDh, està implicat en l'activitat de TREX1 (Brucet *et al.*, 2008). Finalment, hem determinat l'estructura i la regulació de l'expressió de TREX1 induïda per l'IFN- γ (Serra *et al.*, 2011).

Desregulació de l'expressió gènica en l'envelliment

En diferents treballs hem mostrat els canvis moleculars que ocorren en el genoma dels macròfags durant l'envelliment (Herrero *et al.*, 2002; Lloberas i Celada, 2002; Sebastián *et al.*, 2005; 2009a). Atès que el nostre model experimental de macròfags (derivats de moll d'os) *in vitro* és en absència de qualsevol altre tipus cel·lular, podem afirmar que els efectes que observem associats a l'envelliment són propis de les cèl·lules que estudiem. En ratolins vells els nivells d'expressió dels gens de l'MHC de classe II estan disminuïts com a conseqüència d'un defecte en la transcripció (Herrero *et al.*, 2001). A més, hem vist que es requereix l'activitat desacetilasa per a la resposta funcional dependent del factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF) en la diferenciació de les cèl·lules dendrítiques i dels macròfags (Sebastián *et al.*, 2008). Atès que l'activitat desacetilasa exerceix un paper important en l'envelliment en organismes inferiors, aquests resultats ens han portat a estudiar si està implicat en l'envelliment dels macròfags. La proliferació dependent de GM-CSF s'altera en els macròfags del model de ratolí de senescència accelerada (Espía *et al.*, 2008). Hem demostrat que la pèrdua d'E2F1 i E2F2 en els macròfags porta a una replicació del DNA accelerada i induïx la resposta al dany del DNA, que condueix a la senescència cel·lular dependent de p21^{Cip1} (Iglesias-Ara *et al.*, 2010).

Els progenitors de la medulla òssia de ratolins vells tenen deteriorada la capacitat per diferenciar-se en cèl·lules dendrítiques. Això està associat amb una disminució en la proliferació induïda pel GM-CSF i la IL3, encara que la resposta proliferativa en M-CSF no s'altera. Això es correlaciona amb l'escurçament dels telòmers, com vam demostrar en comparar amb els macròfags dels ratolins KO per a la telomerasa. La fosforilació del factor de transcripció STAT5a es troba disminuïda en els macròfags de ratolins vells. Aquest defecte és degut a un augment en la quantitat de ROS, que és també la conseqüència de l'escurçament dels telòmers. Hem trobat una nova via per a la fosforilació de la proteïna, que requereix una oxidació prèvia de proteïnes (Sebastián *et al.*, 2009b).

Agraïments

Agraïm el treball i l'esforç fet a tots els col·laboradors amb els quals hem treballat els últims vint anys, que queden recollits en la bibliografia d'aquest treball.

Bibliografia

- ARPA, L. [et al.] (2009). «IL-4 blocks M-CSF-dependent macrophage proliferation by inducing p21Waf1 in a Stat6-dependent way». *Eur. J. Immunol.*, 39: 514-526.
- BARRACHINA, M. [et al.] (1999). «LPS upregulates MHC class II I-A molecules expression in B lymphocytes at transcriptional and translational level». *Tissue Antigens*, 54: 461-470.
- BASTÚS, N. G. [et al.] (2009a). «Peptide conjugated to gold nanoparticles induces macrophage activation». *Mol. Immunol.*, 46: 743-748.
- (2009b). «Homogeneous conjugation of peptides onto gold nanoparticles enhances macrophage response». *ACS Nano*, 3: 1335-1344.
- BORRÀS, F. [et al.] (1995). «Inhibition of I-Ab gene expression by the transcription factor PU.1». *J. Biol. Chem.*, 270: 24385-24391.
- BRUCET, M. [et al.] (2004). «Regulation of murine TAP1 and LMP2 genes in macrophages by interferon gamma is mediated by Stat1 and IRF-1». *Genes & Immun.*, 5: 26-35.
- (2007). «The structure of dimeric exonuclease TREX1 shows a proline-rich segment that interacts with WW motifs». *J. Biol. Chem.*, 282: 14547-14557.
- (2008). «Structural and biochemical studies of TREX1 inhibited by metals. Identification of a new active histidine conserved in DEDDh exonucleases». *Prot. Sci.*, 17:

- 2059-2069.
- CASALS, C. [et al.] (2007). «LPS upregulates MHC Class II expression on dendritic cells through an AP-1 enhancer without affecting the levels of CIITA». *J. Immunol.*, 178: 6307-6315.
- (2009). «CREB and AP-1 activation regulates MKP-1 induction by LPS or M-CSF and their kinetics correlate with macrophage activation versus proliferation». *Eur. J. Immunol.*, 39: 1902-1913.
- CELADA, A. (1996). «Respuesta inmunitaria. Función del MHC». *Investigación y Ciencia*, 235: 31-32.
- CELADA, A. [et al.] (1984). «Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity». *J. Exp. Med.*, 160: 55-74.
- (1993). «Repression of MHC IAb expression by glucocorticoids: The glucocorticoid receptor inhibits the DNA binding of the X box DNA binding protein». *J. Exp. Med.*, 177: 691-698.
- (1996a). «The transcription factor PU.1 is involved in macrophage proliferation». *J. Exp. Med.*, 184: 61-69.
- (1996b). «Identification of the transcription factors NF-YA and NF-YB as factors A and B that bound to the promoter of the major histocompatibility complex class II gene IAb». *Biochem. J.*, 317: 771-778.
- (1996c). «Identification of a transcription factor that binds to the S box of the I-Ab gene of the MHC». *Biochem. J.*, 313: 737-744.
- (2002). «Macrophage differentiation». *Trends Immunol.* (pòster, març).
- CELADA, A.; MAKI, R. A. (1992). «Transforming growth factor- β enhances the M-CSF and GM-CSF stimulated proliferation of macrophages». *J. Immunol.*, 148: 1102-1105.
- CELADA, A.; NATHAN, C. F. (1994). «Macrophage activation revisited». *Immunol. Today*, 15: 100-102.
- COMALADA, M. [et al.] (2003a). «M-CSF-dependent macrophage proliferation is mediated through a calcineurin-independent but immunophilin-dependent mechanism that mediates the activation of external regulated kinases». *Eur. J. Immunol.*, 33: 3091-3100.
- (2003b). «Decorin reverses the repressive effect of the autocrine-produced TGF- β on mouse macrophage activation». *J. Immunol.*, 170: 4450-4456.
- (2003c). «PKC ϵ is involved in JNK activation that mediates LPS-induced TNF- α , which induces apoptosis in macrophages». *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 285: C1235-C1245.
- (2004). «Macrophage colony-stimulating factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, or IL-3-dependent survival of macrophages, but not proliferation, requires the expression of p21waf1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway». *Eur. J. Immunol.*, 34: 2257-2267.
- (2012). «MKP-1: A critical phosphatase in the biology of macrophages controlling the switch between proliferation and activation». *Eur. J. Immunol.*, 42: 1938-1948.
- CULLELL-YOUNG, M. [et al.] (2001). «The induction of MHC class II I-Aa by IFN γ in macrophages is regulated at different levels». *Immunogenetics*, 53: 136-144.
- ESPÍA, M. [et al.] (2008). «Granulocyte macrophage-colony-stimulating factor-dependent proliferation is impaired in macrophages from senescence-accelerated mice». *J. Gerontol. A Biol. Sci.*, 63: 1161-1167.
- GOÑALONS, E. [et al.] (1998). «Translational control of MHC class II I-A molecules by IFN- γ ». *J. Immunol.*, 161: 1837-1843.
- HERRERO, C. [et al.] (2001). «IFN γ -dependent transcription of MHC class II IAb is impaired in macrophages from aged mice». *J. Clin. Invest.*, 107: 485-493.
- (2002). «Immunesenescence of macrophages. Reduced MHC class II gene expression». *Exp. Gerontol.*, 37: 389-394.
- IGLESÍAS-ARA, A. [et al.] (2010). «Loss of E2F1 and E2F2 in macrophages leads to accelerated DNA replication and induces DNA damage response leading to p21CIP1-dependent cellular senescence». *Oncogene*, 29: 5579-5590.
- KIM, C. [et al.] (2008). «The kinase p38 α serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression». *Nature Immunol.*, 9: 1019-1027.
- KLEMSZ, M. J. [et al.] (1990). «The macrophage and B cell specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene». *Cell*, 61: 113-124.
- (2008). «Pillars article: the macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene». *Cell*, 1990, 61: 113-124». *J. Immunol.*, 181: 1597-1608.
- KROPE, P. [et al.] (2005). «Arginase and polyamines synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis *in vivo*». *FASEB J.*, 19: 1000-1002.
- LLOBERAS, J. [et al.] (1995). «Repression of major histocompatibility complex I-Ab gene expression by dbp A and dbp B (mYB-1) proteins». *Mol. Cell Biol.*, 15: 5092-5099.
- (1997). «Repression mechanisms of the I-Ab gene of the major histocompatibility complex». *Immunobiology*, 198: 249-263.
- (1998). «Glucocorticoids enhances the M-CSF and GM-CSF stimulated proliferation of bone marrow derived macrophages». *Inter. Immunol.*, 10: 593-599.
- (1999a). «The key role of PU.1/Spi-1 in B cells, myeloid cells and macrophages». *Immunol. Today*, 20: 184-189.
- (1999b). «Mechanism of the I-Ab gene expression». *Microbes & Infection*, 1: 935-941.
- LLOBERAS, J.; CELADA, A. (2002). «Effect of aging on macrophage function». *Exp. Gerontol.*, 37: 1323-1329.
- (2009). «p21waf1/CIP1, a CDK inhibitor and a feedback system that controls macrophage activation». *Eur. J. Immunol.*, 39: 691-694.
- MARQUÉS, L. [et al.] (2004). «STAT1 regulates lipopolysaccharide- and TNF- α -dependent expression of transporter associated with antigen processing 1 and low molecular mass polypeptide 2 genes in macrophages by different mechanisms». *J. Immunol.*, 173: 1103-1110.
- MARTÍN, L. [et al.] (2006). «Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases CAT2 expression and activity in bone marrow-derived macrophages». *Am. J. Physiology Cell. Physiol.*, 290: C1364-1372.
- PASCUAL-GARCÍA, M. [et al.] (2011). «Liver X receptors inhibit macrophage proliferation through downregulation of cyclins D1 and B1 and cyclin-dependent kinases 2 and 4». *J. Immunol.*, 186: 4656-4667.
- SÁNCHEZ-TILLÓ, E. [et al.] (2006a). «Cyclophilin A is required for M-CSF-dependent macrophage proliferation». *Eur. J. Immunol.*, 36: 2515-2524.
- (2006b). «Macrophage-colony-stimulating factor-induced proliferation and lipopolysaccharide-dependent activation of macrophages requires Raf-1 phosphorylation to induce mitogen kinase phosphatase-1 expression». *J. Immunol.*, 176: 6594-6602.
- (2007). «JNK1 is required for the induction of MKP1 expression in macrophages during proliferation and LPS-dependent activation». *J. Biol. Chem.*, 282: 12566-12573.
- SANS-FONS, G. [et al.] (2013). «Arginine transport is impaired in C57Bl/6 mouse macrophages as a result of a deletion in the promoter of Slc7a2 (CAT2), and susceptibility to *Leishmania* infection is reduced». *J. Infect. Dis.*, 207: 1684-1693.
- SEBASTIÁN, C. [et al.] (2005). «Macrophage aging: a cellular and molecular review». *Immunobiology*, 210: 121-126.
- (2008). «Deacetylase activity is required for STAT5-dependent GM-CSF functional activity in macrophages and differentiation to dendritic cells». *J. Immunol.*, 180: 5898-5906.
- (2009a). «Molecular and cellular aspects of macrophage aging». A: Fulop, T.; Franceschi, C.; Hirokawa, K.; Pawelec, G. (ed.). *Handbook on immunosenescence: basic understanding and clinical applications*. Springer, p. 919-945.
- (2009b). «Telomere shortening and oxidative stress in aged macrophages results in impaired STAT5a phosphorylation». *J. Immunol.*, 183: 2356-2364.
- SERRA, M. [et al.] (2011). «Characterization of Trex1 induction by IFN- γ in murine macrophages». *J. Immunol.*, 186: 2299-2308.
- SERRAT, N. [et al.] (2010). «The locus control region of the MHC class II promoter acts as a repressor element, the activity of which is inhibited by CIITA». *Mol. Immunol.*, 47: 825-832.
- (2012). «Deacetylation of C/EBP β is required for IL-4-induced arginase-1 expression in murine macrophages». *Eur. J. Immunol.*, 42: 3028-3037.
- SOLER, C. [et al.] (2001). «Macrophage requires different nucleoside transport systems for proliferation and activation». *FASEB J.*, 15: 1979-1988.
- (2003). «IFN- γ regulates nucleoside transport systems in macrophages through STAT1-dependent and -independent signalling pathways». *Biochem. J.*, 375: 777-783.
- VALLEDOR, A. F. [et al.] (1998). «Transcription factors that regulate monocyte-macrophage differentiation». *J. Leuk. Biol.*, 63: 405-417.
- (1999). «M-CSF induces the expression of the phosphatase MKP-1 in macrophages through a PKC-dependent pathway». *J. Immunol.*, 163: 2452-2462.
- (2000a). «The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage responses towards proliferation or activation». *J. Biol. Chem.*, 275: 7403-7409.
- (2000b). «PKC ϵ mediates the lipopolysaccharide-induced expression of the phosphatase MKP-1 in bone marrow-derived macrophages». *J. Immunol.*, 164: 29-37.
- (2008). «Selective roles of MAPKs during the macrophage response to IFN- γ ». *J. Immunol.*, 180: 4523-4529.
- (2010a). «Macrophage foam cells». A: *Encyclopedia of life sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, p. 1-10.
- (2010b). «Macrophage pro-inflammatory activation and de-activation: a question of balance». *Advances Immunol.*, 108: 1-20.
- XAUS, J. [et al.] (1999a). «Adenosine inhibits M-CSF-dependent proliferation of macrophage through the induction of p27^{kip-1}». *J. Immunol.*, 163: 4140-4149.
- (1999b). «IFN γ up-regulates the A2B adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation». *J. Immunol.*, 162: 3607-3614.
- (1999c). «Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis». *Immunology*, 11: 103-113.
- (2000a). «The expression of MHC class II genes in macrophages is cell cycle-dependent». *J. Immunol.*, 165: 6364-6371.
- (2000b). «LPS induces apoptosis in murine macrophages mostly through the autocrine production of TNF α ». *Blood*, 95: 3823-3831.
- (2001a). «Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis». *Immunobiology*, 204: 543-550.
- (2001b). «Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27^{kip1} and p21^{waf1}». *Blood*, 98: 2124-2133.
- (2003). «High-expression of p21Waf1 in sarcoid granulomas: a putative role for long-lasting inflammation». *J. Leuk. Biol.*, 74: 295-301.
- YERAMIAN, A. [et al.] (2006a). «Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages». *J. Immunol.*, 176: 5918-5924.
- (2006b). «Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation». *Eur. J. Immunol.*, 36: 1516-1526.