



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

El rol de los macrófagos en el Síndrome de Aicardi-Goutières

Tania Vico Rivero



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Programa de Doctorado en Biomedicina

El rol de los macrófagos en el Síndrome de Aicardi-Goutières

Memoria presentada por
Tania Vico Rivero

Para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología
Laboratorio del grupo Biología del Macrófago

El director de la tesis
Dr. Antonio Celada Cotarelo
Catedrático de Inmunología

El director de la tesis
Dr. Jorge Lloberas Cavero
Profesor Agregado de Inmunología

*Thanks for all you've done
I've missed you for so long
I can't believe you're gone
You still live in me
I feel you in the wind
You guide me constantly
and I know you're a part of me
and you always will,
Isabel & Maruja*

Alter bridge

Agradecimientos

Esta tesis doctoral refleja el resultado del esfuerzo de muchas personas, que me han ayudado tanto a nivel científico como en el personal, durante mi estancia en el grupo Biología del Macrófago de la Universidad de Barcelona.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis mentores Antonio Celada y Jorge Lloberas de la Universidad de Barcelona, por haberme aceptado en su grupo y darme la oportunidad de sumergirme en el mundo de la ciencia. Hace ya cinco años de aquella charla con mi profesor de Bioquímica Javier Casado, el responsable de que iniciase esta aventura. Al final de mis estudios en Biología buscaba un grupo de investigación donde poder desarrollar mi proyecto final de carrera. Acudí a Javier en busca de ayuda y me dio el mejor consejo: "Olvídate de tu expediente ¿Qué es lo que más te gustaría hacer?". Mi respuesta fue rotunda, Inmunología. Y así fue como llegué a vuestra casa, donde hemos compartido todos estos años que me han permitido evolucionar tanto a nivel científico como en lo personal.

También me gustaría agradecer la generosidad del Profesor David Bonthron (*Leeds Institute of Molecular Medicine*, Universidad de Leeds) por cedernos los ratones *Samhd1 knock-out* y *Rnasa h2c knock-in* que nos han permitido realizar este trabajo.

Querría mencionar a Eva Martínez (Germans Trias i Pujol, División de Inmunología) por su ayuda en el modelo de EAE. Sobre todo, dar las gracias a María José Mansilla por darme la oportunidad de presenciar la inducción del modelo y resolver todas mis dudas con una gran amabilidad.

Además, me gustaría expresar mi gratitud a mis compañeros de viaje. No podría haber tenido una tutora más estupenda en mi proyecto final de carrera, María Gloria Sans. Muchísimas gracias por contagiarme tu gran amor por la ciencia. De hecho, Selma Pereira, gran científica y bellísima persona, me llamaba su "miniyo". Pero siempre fue un halago, ya que eres y serás siempre un gran referente para mí. Ya han pasado dos años desde que empecé este nuevo proyecto, tiempo en el que Juan Tur y Ester Ruiz han sido un gran apoyo.

Agradecimientos

Querría agradecerles todos los consejos y embaucarme en su gran afición a los cafés que me permitieron seguir adelante (y arruinarme). En definitiva, muchas gracias a todas esas personitas que han ido pasando por nuestro querido “zulo” con las que he compartido grandes momentos como el súper *hit* “Otro amor vendrá” que nunca olvidaré.

Por último, y no por eso menos importante, agradecer a mi familia todo el esfuerzo y el apoyo que me han brindado de manera incondicional. Muchísimas gracias por todo lo que habéis hecho, hacéis y haréis. Lo sois todo, no lo hubiera logrado sin vosotros. Gracias a las amistades que no me han dejado perder la cabeza con el doctorado (o eso creo). Pero sobre todo, querría dar las gracias a Javier Blanco por hacerme más feliz si cabe durante estos 9 años y haberme aguantado en esta última etapa del doctorado.

Querría mencionar a la Universidad de Barcelona por haber hecho posible mi formación como científica. Espero que puedan continuar ofreciendo esta gran oportunidad y ayudando a cultivar las mentes de las nuevas generaciones de científicos.

- Ayuda de personal investigador predoctoral en formación (APIF), Eurolife.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

eurolife
network of european universities in life sciences

Índice

| | |
|---|-----------|
| AGRADECIMIENTOS | 5 |
| ÍNDICE | 7 |
| Lista de figuras y tablas..... | 13 |
| ▪ Lista de figuras | 15 |
| ▪ Lista de tablas..... | 18 |
| Lista de abreviaciones..... | 19 |
| INTRODUCCIÓN | 27 |
| El sistema inmunitario..... | 29 |
| La respuesta inflamatoria | 31 |
| Los macrófagos | 32 |
| ▪ Origen y ontogenia de los macrófagos | 34 |
| ▪ Proliferación de los macrófagos | 36 |
| ▪ Activación de los macrófagos..... | 36 |
| Los interferones y sus receptores | 39 |
| LPS y TLR4 | 41 |
| Señalización de los ácidos nucleicos..... | 44 |
| El daño en el ADN..... | 45 |
| ▪ Respuesta al daño en el ADN | 47 |
| ▪ Puntos de control en el ciclo celular | 48 |
| ▪ Los macrófagos y el daño en el ADN | 49 |
| El Síndrome de Aicardi-Goutières y las interferonopatias de tipo I..... | 52 |
| ▪ El origen de los ácidos nucleicos en el AGS | 56 |
| ▪ Las células que inician el AGS..... | 59 |
| ▪ Proteína 1 con dominio SAM y HD (SAMHD1) | 61 |
| Estructura y función de Samhd1 | 61 |
| Enfermedades asociadas a Samhd1 | 62 |
| Modelo en ratón para el AGS: Samhd1 ^{-/-} | 64 |

| | |
|--|-----------|
| ▪ El complejo Ribonucleasa H2 (RNasaH2) | 66 |
| Estructura y funciones del complejo RNasaH2 | 66 |
| Enfermedades asociadas a RNasaH2..... | 67 |
| Modelo en ratón para el AGS: RNasa H2 ^{R69W/R69W} | 68 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 71 |
| Hipótesis | 73 |
| Objetivos | 73 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 75 |
| Ratones..... | 77 |
| Cultivos celulares | 77 |
| Reactivos | 78 |
| Genotipación..... | 78 |
| Análisis de la expresión génica..... | 79 |
| Análisis proteico | 81 |
| Citometría de flujo..... | 83 |
| Proliferación celular | 85 |
| Microscopia de fluorescencia | 85 |
| Modelo animal: EAE | 86 |
| Análisis estadístico | 87 |
| RESULTADOS | 89 |
| Samhd1 y RNasa H2 en los macrófagos | 91 |
| ▪ Los estímulos proinflamatorios en los macrófagos inducen a <i>Samhd1</i> , mientras que la expresión del complejo RNasaH2 no se modifica..... | 91 |
| ▪ La ausencia de <i>Samhd1</i> o <i>Rnasa h2c</i> en ratones se asocia con una sobrexpresión de los genes estimulados con interferón (ISGs) | 97 |
| ▪ <i>Samhd1</i> y RNasa H2 no afectan a la diferenciación de los macrófagos derivados de la médula ósea..... | 102 |

| | |
|--|------------|
| ▪ Samhd1 y RNasa H2 no afectan la proliferación de los macrófagos | 105 |
| ▪ Samhd1 y RNasa H2 no afectan la activación de los macrófagos..... | 107 |
| ▪ Samhd1 y RNasa H2 no afectan la activación proinflamatoria de los macrófagos | 110 |
| ▪ Samhd1 y RNasa H2 protegen del daño en el DNA causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) en los macrófagos..... | 112 |
| ▪ Samhd1 y RNasa H2 no afectan en el metabolismo de las ROS | 118 |
| Samhd1 y RNasa H2 en enfermedades autoinmunes y en inflamación..... | 120 |
| ▪ La ausencia de Samhd1 aumenta la severidad del modelo EAE | 120 |
| DISCUSIÓN..... | 125 |
| CONCLUSIONES..... | 139 |
| BIBLIOGRAFÍA | 143 |

Lista de figuras y tablas

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. La respuesta frente a una infección se lleva a cabo a través de una serie de etapas, interviniendo inicialmente la inmunidad innata y posteriormente la adaptativa. | 30 |
| Figura 2. Función dual de los macrófagos durante la respuesta inflamatoria. ... | 32 |
| Figura 3. Principales funciones de los macrófagos..... | 33 |
| Figura 4. Heterogeneidad del origen de los macrófagos residentes. | 35 |
| Figura 5. Rol de los macrófagos activados por la vía clásica (M1) o alternativa (M2) en el daño y en la reparación tisular..... | 37 |
| Figura 6. Los interferones de tipo I, II y III y sus receptores. | 40 |
| Figura 7. Señalización del complejo LPS-TLR4..... | 42 |
| Figura 8. Resumen de las vías de señalización de ácidos nucleicos en el endosoma y en el citosol..... | 45 |
| Figura 9. Agentes que dañan el ADN, tipo de lesiones y las vías de reparación. | 46 |
| Figura 10. La respuesta al daño en el ADN. | 47 |
| Figura 11. Esquema del ciclo celular y las principales proteínas implicadas en su regulación. | 49 |
| Figura 12. La señalización de las ROS depende de su concentración. | 50 |
| Figura 13. Nbs1 controla las funciones de los macrófagos. | 51 |
| Figura 14. Señalización mediada por IFN de tipo I y las interferonopatías de tipo I..... | 52 |
| Figura 15. Mutaciones en TREX1, RNASAH2 (A, B y C), SAMHD1, ADAR y IFIH1 asociadas a AGS..... | 55 |
| Figura 16. Acumulación de los ácidos nucleicos endógenos por la pérdida de la función de proteínas relacionadas con el AGS..... | 57 |
| Figura 17. Las proteínas relacionadas con el AGS y el metabolismo de los retrotransposones..... | 58 |
| Figura 18. Contradicciones en el origen del AGS..... | 60 |
| Figura 19: Esquema de la oligomerización de SAMHD1..... | 61 |
| Figura 20. Esquema del gen de Samhd1 y la localización de las mutaciones en AGS y cáncer. | 63 |

| | |
|---|-----|
| Figura 21. SAMHD1 en humanos y ratones..... | 65 |
| Figura 22: Estructura del complejo RNasa H2. | 66 |
| Figura 23. Mutaciones en el gen de la <i>Rnasa h2c</i> que causan AGS..... | 68 |
| Figura 24. Estrategia en el análisis por citometría de flujo. | 84 |
| Figura 25. Distribución tejido-específica de <i>Samhd1</i> | 91 |
| Figura 26. Distribución tejido-específica de <i>Rnasah2a</i> , <i>Rnasah2b</i> y <i>Rnasah2c</i> . 93 | |
| Figura 27. <i>Samhd1</i> se induce en los macrófagos por estímulos proinflamatorios. | 94 |
| Figura 28. El complejo RNasa H2 en los macrófagos no se modifica mediante activadores o factores de crecimiento. | 96 |
| Figura 29. Sobreexpresión de ISGs en el cerebro y el corazón de los ratones <i>Samhd1</i> ^{-/-} | 98 |
| Figura 30. Sobreexpresión de ISGs en el cerebro y el corazón de los ratones <i>Rnasa h2c</i> ^{R69W/R69W} | 99 |
| Figura 31. Sobreexpresión de ISGs en los macrófagos <i>Samhd1</i> ^{-/-} y <i>Rnasa h2c</i> ^{R69W/R69W} .. | 101 |
| Figura 32. El número de macrófagos derivados de medula ósea no está afectado por el déficit de <i>Samhd1</i> o RNasa H2. | 102 |
| Figura 33. La diferenciación en los macrófagos no está afectada por <i>Samhd1</i> o RNasa H2. | 104 |
| Figura 34. La proliferación en los macrófagos no está afectada por <i>Samhd1</i> o RNasa H2. | 105 |
| Figura 35. La progresión en el ciclo celular dependiente de M-CSF en los macrófagos no está afectada por <i>Samhd1</i> o RNasa H2..... | 106 |
| Figura 36. La proliferación en los macrófagos activados con estímulos proinflamatorios no está afectada por <i>Samhd1</i> o RNasa H2..... | 108 |
| Figura 37. La carencia de <i>Samhd1</i> o RNasa H2 no afecta la viabilidad de los macrófagos activados con estímulos proinflamatorios..... | 109 |
| Figura 38. <i>Samhd1</i> y RNasa H2 no afectan la activación proinflamatoria de los macrófagos..... | 111 |
| Figura 39. <i>Samhd1</i> y RNasa H2 no afectan la activación antiinflamatoria de los macrófagos..... | 112 |

| | |
|--|-----|
| Figura 40. Incremento de la expresión de p21 ^{waf-1} en los macrófagos <i>Samhd1</i> ^{-/-} y <i>Rnasa h2c</i> ^{R69W/R69W} | 113 |
| Figura 41. <i>Samhd1</i> protege a los macrófagos del daño en el ADN causado por estímulo proinflamatorios. | 115 |
| Figura 42. RNasa H2 protege a los macrófagos del daño en el ADN causado por estímulos proinflamatorios. | 116 |
| Figura 43. El daño en el ADN en los macrófagos activados por agente proinflamatorios se debe a la producción de las ROS. | 117 |
| Figura 44. <i>Samhd1</i> y RNasa H2 no afectan en la producción de las ROS en los macrófagos. | 119 |
| Figura 45. <i>Samhd1</i> y RNasa H2 no afectan en la eliminación de las ROS en los macrófagos proinflamatorios. | 120 |
| Figura 46. La ausencia de <i>Samhd1</i> aumenta la severidad del modelo EAE.... | 122 |
| Figura 47. La deficiencia parcial de RNasa H2 no influye en la severidad del modelo EAE..... | 123 |
| Figura 48. Balance de la activación proinflamatoria en los macrófagos..... | 129 |
| Figura 49. Mecanismo de supervivencia de los macrófagos en el foco inflamatorio..... | 137 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Cebadores utilizados en la genotipación de los ratones <i>Samhd1</i> ^{-/-} | 79 |
| Tabla 2. Cebadores utilizados en la genotipación de los ratones <i>Rnasa2c</i> ^{R69W/R69W} | 79 |
| Tabla 3. Cebadores utilizados en las PCR en tiempo real..... | 81 |
| Tabla 4. Anticuerpos fluorescentes utilizados en el análisis por citometría de flujo..... | 83 |

Lista de abreviaciones

ADAR1 o ADAR: *Adenosine deaminase acting on RNA 1*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGS: Síndrome de Aicardi-Goutières

AIM2: *Absent in melanoma 2*

AML1: *Acute myeloid leukemia 1*

AP1: *Transcription factor activator protein 1*

APLS: Síndrome linfoproliferativo autoinmune

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

AT: Ataxia-telangiectasia

ATM: *Ataxia-telangiectasia-mutated*

ATP: Trifosfato de adenosina

ATR: *Ataxia telangiectasia and Rad3-related*

ATRIP: *ATR-interacting protein*

BER: *DNA base excision repair*

BMDM: Macrófagos derivados de médula ósea

BSA: Albúmina sérica bovina

C/EBP: *CCAAT/enhancer-binding protein*

CD: Cluster of differentiation

CDK: Quinasa dependiente de ciclina

cGAS: Sintasa de GMP-AMP cíclico

CHK: Serina/treonina quinasa

CLL: Leucemia linfocítica crónica

cMoP: *Common monocyte progenitor*

CMP: *Common myeloid progenitor*

CNS: Sistema nervioso central

CSF1R (o CD115): Receptor del M-CSF

CSF2R (o CD116): Receptor del GM-CSF

CtIP: *CtBP-interacting protein*

DAMPs: *Danger-associated molecular patterns*

DCF-DA: 2'7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

DDR: Respuesta al daño en el ADN

Lista de abreviaciones

dGTP: Trifosfato de desoxiguanosina
dN: Desoxinucleosido
dNTP: Desoxinucleotido
DSB: *Double strand break*
dsRNA: RNA de cadena doble
EGF: *Epidermal growth factor*
ERK: *Extracellular signal regulated kinase*
FBS: Suero fetal bovino
FS: Dispersión frontal
GAS: *Gamma-activated site*
GM-CSF: *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*
GMP: *Granulocyte -macrophage progenitor*
GTP: Guanosín trifosfato
H₂O₂: Peróxido de hidrogeno
HD: Dominio histidina-aspártico
HMGB1: *High mobility group box 1*
HR: Recombinación homóloga
HSC: *Hematopoietic stem cell*
HSP: *Heat shock protein*
IFN: Interferón
IFNAR: Receptor de IFN- α
IFNGR: Receptor de IFN- γ
IFNLR o IL28RA: receptor IFN- λ
IKK (NEMO): El complejo quinasa I κ B
IL: interleucina
IL-R: Receptor de interleucina
IR: Radiación ionizante
IRAK: *IL-1-receptor associated kinase*
IRF: Factor regulador del interferón
ISG: Gen estimulado por interferón
ISGF: Factor estimulador de genes
ISRE: *Interferon stimulated response element*

I κ B: *inhibitor of κ B*

JAK: Janus quinasa

JNK: *c-jun NH2-terminal kinase*

LBP: *LPS binding protein*

LPS: Lipopolisacarido

Ly6C: *Lymphocyte antigen 6 complex*

Mal: *MyD88-adaptor-like*

MAPK: *Mitogen-activated MAP kinase*

M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor*

MDA5 (IFIH1): *melanoma differentiation associated gene 5*

MDP: *Monocyte and dendritic cell progenitor*

MEK: *MAPK/ERK Kinase*

MHC: *Major histocompatibility complex*

M-MLV: *Moloney murine leukemia virus*

MMR: *Mismatch repair*

MRN: *MRE11-RAD50-NBS1*

MyD88: *Myeloid differentiation factor 88*

NAC: N-acetil cisteína

NEMO: *NF κ B essential modifier*

NER: *Nucleotide excision repair*

NF κ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NHEJ: *Non-homologous end joining*

NLR: *NOD-like receptor*

OAS1: *Oligoadenylate synthetase 1*

PAMPs: *Patrones Moleculares Asociados a Patógenos*

PBS: *Tampón fosfato salino*

PIKKs: *Phosphatidylinositol 3-kinase related kinases*

PKR: *(dsRNA)-Activated protein kinase R*

PPP: *Trifosfato inorgánico*

PRR: *Pattern recognition receptor*

RIG-I: *Retinoic acid inducible gene I*

RIP1: *Receptor-interacting protein 1*

Lista de abreviaciones

RLR: *RIG-I-Like receptor*

RNasa H2: El complejo Ribonucleasa H2

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPA: La proteína de replicación A

RRH: RAD9-RAD1-HUS1

RT: Retrotranscriptasa

SAM: Motivo estéril alfa

SAMHD1: Proteína 1 con dominio SAM y HD

SCKL: Síndrome Seckel

SLE: lupus eritematoso sistémico

SOD: Superóxido dismutasa

SS: Dispersión lateral

SSB: *Single strand break*

SSBR: *Single strand break repair*

STAT: *Signal transducer and activator of transcription*

STING: *Stimulator of Interferon Genes*

TAK1: *Serine-threonine Kinase 1*

TANK: *TRAF family membrane-associated NFkB activator*

TBK1: *Tank-binding kinase 1*

TGFβ: *Transforming growth factor β*

Th: *T helper*

TIRAP: *TIR-domain containing adapter protein*

TLR: *Toll-like receptor*

TNFα: *Tumor necrosis factor α*

TRAF: *Tumor necrosis factor receptor-associated factor*

TRAM: *TRIF-related adapter molecule*

Trex1: *Three prime repair exonuclease 1*

TRIF: *TIR-domain-containing adapter inducing interferon-β*

TYK: Tirosina quinasa

UV: Luz ultravioleta

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VIS: Virus de la inmunodeficiencia en simios

Vpx: Proteína vírica X

WT: Wild type

Introducción

EL SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmunitario está formado por una gran variedad de células y moléculas que actúan de manera conjunta y coordinada. Es una red muy compleja que otorga al organismo protección frente a múltiples enfermedades, como las infecciones, y es crítica para su supervivencia. Además, el sistema inmunitario interactúa con otros sistemas del organismo a fin de mantener la homeostasis. Por ejemplo, interviene en el metabolismo de los lípidos, hidratos de carbono y del hierro, la reparación tisular y en las funciones del sistema nervioso. En definitiva, el sistema inmunitario es capaz de reconocer las modificaciones, tanto ambientales como fisiológicas, y adaptarse a éstas restableciendo el equilibrio en el organismo (Rankin and Artis, 2018).

Este sistema tan crítico en la homeostasis del organismo necesita una fina regulación. De hecho, cuando se produce una activación excesiva del sistema inmunitario o por el contrario ésta es insuficiente, puede conllevar la muerte del individuo. Frente a una infección, dependiendo de la resistencia del individuo y de la capacidad del microorganismo para evadir los sistemas de defensa, vencerá uno u otro (Cooper and Alder, 2006). La defensa se lleva a cabo a través de una serie de etapas. La primera línea de defensa incluye barreras físicas y químicas no específicas, como son las células epiteliales unidas mediante zonas de oclusión, el flujo longitudinal de aire o líquido, los ácidos grasos en la piel, el pH bajo en el intestino, los péptidos antimicrobianos producidos en las mucosas, etc. Si durante las primeras 4 horas el patógeno consigue atravesar estas defensas interviene el sistema inmunitario innato, formado por mecanismos capaces de reconocer estructuras comunes de distintos grupos de patógenos (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, PAMPs). En la fase temprana, entre las 4 y 96 horas, se produce el reclutamiento de las células y las moléculas al foco de la inflamación. Incluye células fagocitarias como los macrófagos y los neutrófilos, y proteínas séricas como el complemento y otros mediadores que participan en la respuesta inmunitaria. Generalmente los mecanismos de defensa del sistema inmunitario innato eliminan a la mayoría de los microorganismos. Sin embargo, si no es

suficiente a partir de las 96 horas entran en acción los mecanismos del sistema inmunitario adaptativo para fortalecer las defensas del organismo. Éste surge como respuesta a la infección y se adapta a ella. Está formado por mecanismos con gran diversidad y especificidad antigénica, permitiéndolo discernir lo propio de lo ajeno. Éstos incluyen los linfocitos y las moléculas que éstos producen, como son los anticuerpos y las citocinas. Además, el sistema inmunitario adaptativo tiene memoria, es decir, cuando el huésped está expuesto nuevamente a un mismo microorganismo, la respuesta es más rápida, fuerte y eficaz. De hecho, la memoria es la base inmunológica de las vacunas (Figura 1) (Cooper and Alder, 2006).

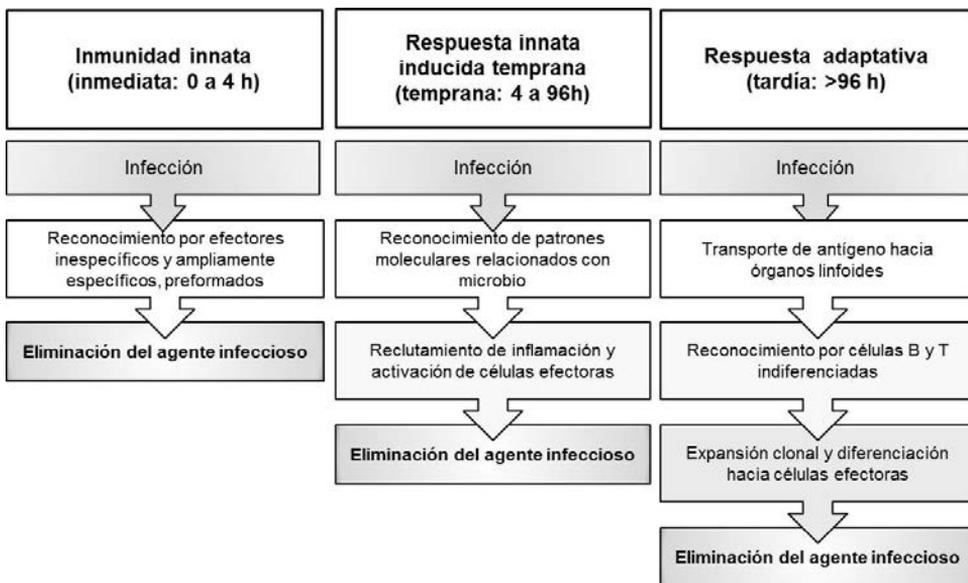


Figura 1. La respuesta frente a una infección se lleva a cabo a través de una serie de etapas, interviniendo inicialmente la inmunidad innata y posteriormente la adaptativa. (Figura adaptada de Murphy and Weaver, 2017).

Así pues, el sistema inmunitario está diseñado para proteger al huésped en distintos niveles. No obstante, un mal funcionamiento puede provocar lesiones tisulares y enfermedades, como las alergias, las enfermedades autoinmunes o las inmunodeficiencias (Murphy and Weaver, 2017; Parkin and Cohen, 2001).

LA RESPUESTA INFLAMATORIA

La primera respuesta del sistema inmunitario ante una agresión es la inflamación. Ésta se caracteriza por un aumento del flujo de proteínas séricas y leucocitos de la sangre hacia los tejidos extravasculares. Clínicamente se describe por los síntomas definidos por Celso desde hace más de 2000 años: calor, edema, rubor, dolor y la pérdida de la función. En la inflamación inicialmente se promueve la vasodilatación en la zona afectada y el aumento de la permeabilidad capilar, facilitando así la entrada de las proteínas plasmáticas al tejido. También se produce la expresión y la restructuración de las moléculas de adhesión en las células endoteliales, y la liberación de factores quimiotácticos. De este modo se permite la entrada de las células circulantes al foco inflamatorio. Las primeras células en llegar son los neutrófilos, que mueren por apoptosis tras reconocer y fagocitar a los microorganismos. En una fase más tardía aparecen los monocitos, que finalmente se diferenciarán en macrófagos. Los macrófagos proinflamatorios fagocitan el material ajeno, los restos celulares y los cuerpos apoptóticos, y producen mediadores proinflamatorios. Finalmente, los macrófagos adquieren actividades antiinflamatorias y se induce el proceso de resolución de la respuesta mediante la liberación de mediadores antiinflamatorios, dando inicio a los procesos de reparación y cicatrización del tejido dañado (Figura 2) (Lawrence et al., 2002).

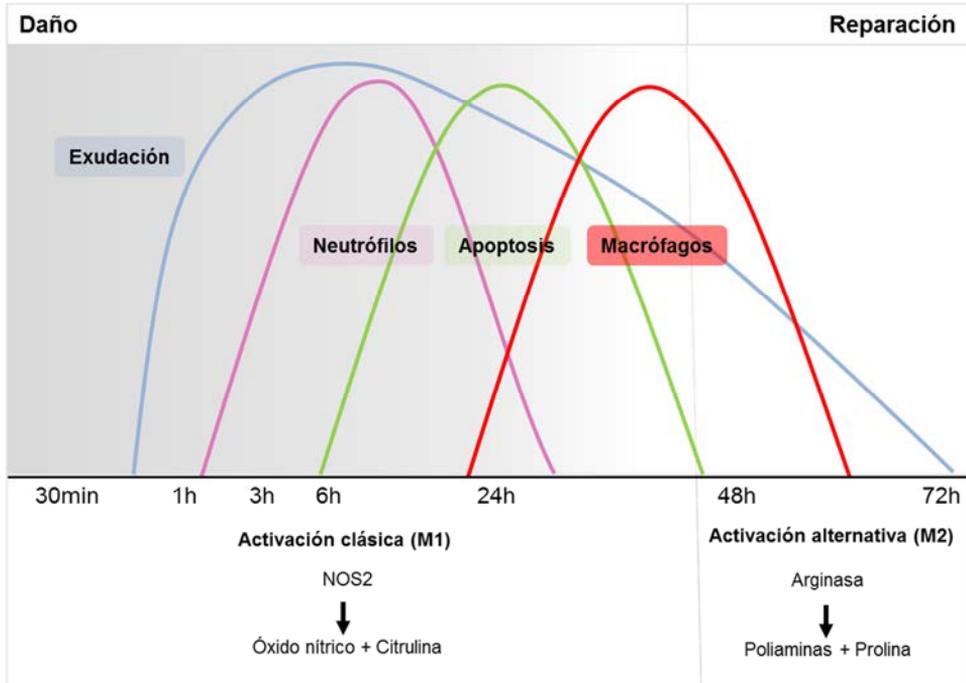


Figura 2. Función dual de los macrófagos durante la respuesta inflamatoria. Los macrófagos tienen una actividad inicialmente proinflamatoria (destructora) y posteriormente antiinflamatoria (reparadora) induciendo la resolución de la inflamación (Figura adaptada de Lawrence et al., 2002).

LOS MACRÓFAGOS

Los macrófagos son células con capacidad fagocítica pertenecientes a la estirpe mieloide del sistema inmunitario. Poseen una gran heterogeneidad fenotípica, por lo que desarrollan un elevado número de funciones según el microambiente en el que se encuentren, especialmente en relación con los factores de crecimiento y las citocinas. No solamente participan en la defensa frente a patógenos, sino que también intervienen en el mantenimiento de la homeostasis (Figura 3) (Akagawa, 2002a; Akagawa et al., 2006a; Davies et al., 2013).

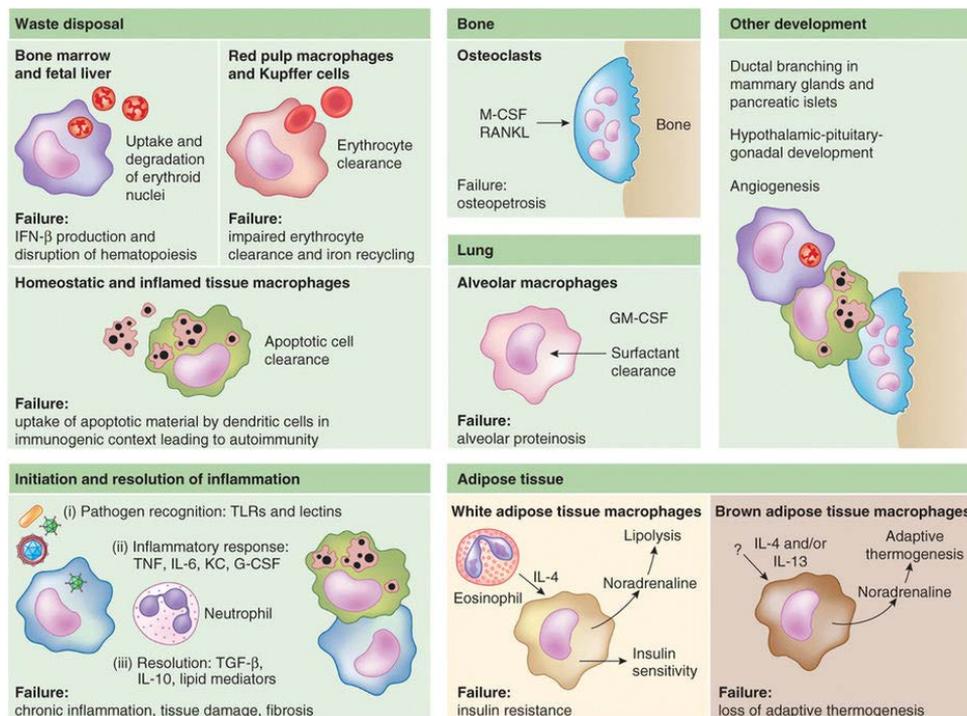


Figura 3. Principales funciones de los macrófagos. Funciones de los macrófagos residentes en los distintos tejidos y las consecuencias cuando éstas fallan (Davies et al., 2013).

Los macrófagos proliferan bajo el estímulo de factores de crecimiento, de los cuales el factor estimulador de colonias de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) es el más potente y específico. En presencia de estímulos proinflamatorios se bloquea su proliferación y se inducen sus actividades funcionales, como la secreción de citocinas, la producción de metabolitos tóxicos o la fagocitosis de los patógenos (Plowden et al., 2004; Schroder et al., 2004; Xaus et al., 2001). Cuando la respuesta innata es insuficiente para eliminar los agentes patógenos, los macrófagos crean y modulan el microambiente inflamatorio. De este modo se produce el reclutamiento de las células del sistema inmunitario adaptativo que ayudarán y potenciarán la respuesta para eliminar a los patógenos (Plowden et al., 2004). En ausencia de estímulo, los macrófagos mueren por apoptosis, manteniéndose

equilibrado el número de células efectoras por el continuo flujo desde la médula ósea (Celada and Nathan, 1994; Xaus et al., 2001)

Origen y ontogenia de los macrófagos

Inicialmente se creía que los monocitos circulantes en la sangre, derivados de médula ósea, eran los únicos precursores de los macrófagos residentes en los tejidos. En los últimos años se ha determinado que algunas poblaciones se establecen en las fases de la etapa prenatal. Éstas se originan a partir de progenitores derivados del saco vitelino o del hígado fetal, y se mantienen de manera independiente. No obstante, los macrófagos derivados de médula ósea pueden complementar estas poblaciones en situaciones de estrés, como por ejemplo en la inflamación. Además, durante la etapa adulta la médula ósea es la principal fuente de macrófagos (Figura 4). Allí se encuentran las células madre hematopoyéticas (*hematopoietic stem cell*, HSC), que dan lugar a la estirpe mieloide del sistema inmunitario en respuesta a varias citocinas y factores de crecimiento. Así pues, los monocitos se desarrollan mediante la diferenciación a partir del progenitor común mieloide (*common myeloid progenitor*, CMP), que da lugar al progenitor de granulocitos-macrófagos (*granulocyte-macrophage progenitor*, GMP), y posteriormente al progenitor de células dendríticas y monocitos (*monocyte and dendritic cell progenitor*, MDP). Finalmente se diferencia al progenitor común de monocitos (*common monocyte progenitor*, cMoP) que da origen a los monocitos Ly6C^{high} (proinflamatorios) y estos a los Ly6C^{low} (antiinflamatorios). Finalmente, los monocitos generados en la médula ósea son liberados al torrente sanguíneo y migran a los tejidos donde pueden diferenciarse en macrófagos (Guilliams and Scott, 2017; Udalova et al., 2016).

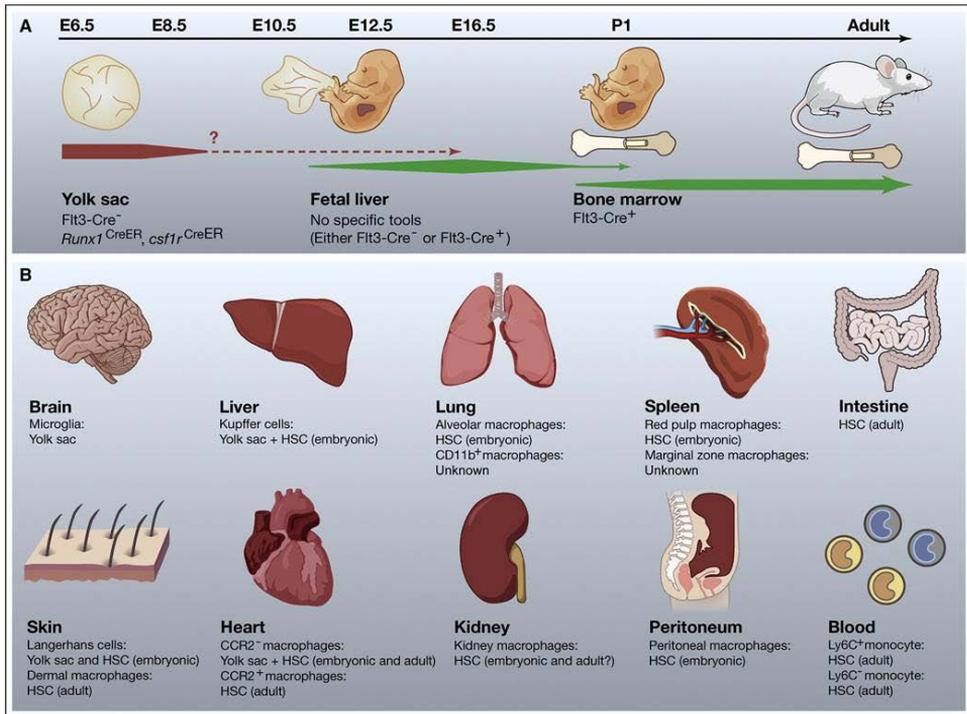


Figura 4. Heterogeneidad del origen de los macrófagos residentes. El origen de los macrófagos (saco vitelino, hígado fetal o médula ósea) depende del tejido y cambia durante el desarrollo del individuo (Epelman et al., 2014).

El programa genético que lleva a la diferenciación de los monocitos, está determinado por la expresión de una serie de factores de transcripción: PU.1 (producto del gen *Spi1* en ratón) (Lloberas et al., 1999), CCAAT/*enhancer-binding protein* (C/EBP) y la proteína asociada a la leucemia mieloide aguda (*acute myeloid leukemia 1*, AML1) (Valledor et al., 1998). Estos factores durante la mielopoyesis promueven la expresión de receptores, como el receptor del M-CSF (CSF1R o CD115) (Celada et al., 1996) o del *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) (CSF2R o CD116), requeridos en la diferenciación, la proliferación y la supervivencia de los macrófagos. Así pues, durante la mielopoyesis y la diferenciación de los monocitos/macrófagos es esencial la presencia de citocinas y factores de crecimiento, principalmente del M-CSF (Celada et al., 1996; Hohaus et al., 1995; Smith et al., 1996).

Proliferación de los macrófagos

Los factores de crecimiento son indispensables para la supervivencia, proliferación, diferenciación y la activación de las células hematopoyéticas. El M-CSF lo producen principalmente los fibroblastos, células endoteliales, células del estroma, macrófagos, células del músculo liso y los osteoblastos (Burgess and Metcalf, 1980). Éste se encuentra en la circulación, en forma de glicoproteína o proteoglicano, y también unido a la membrana celular donde actúa como regulador local (Dai et al., 2004). Los monocitos y los macrófagos responden al M-CSF a través de su receptor específico CSF1R, en forma de homodímero y con un dominio intracelular tirosina-quinasa (Pixley and Stanley, 2004; Sherr et al., 1985). La unión del M-CSF a su receptor da lugar a la fosforilación de los residuos tirosina en la región intracitoplasmática y de sus sustratos inmediatos, permitiendo así la activación de diferentes vías de señalización que inducen la proliferación y la supervivencia (Chitu and Stanley, 2006; Comalada et al.; Hamilton, 1997; McCubrey et al., 2000; Pixley and Stanley, 2004; Stanley et al., 1997). Las principales vías implicadas son la vía *Raf-MAPK/ERK Kinase-Extracellular signal regulated kinase 1/2 (Raf-MEK-ERK1/2)*, crítica en la proliferación celular (Valledor et al., 2000) y las vías de las *Mitogen-activated MAP kinase (MAPK)*, como *Rac/c-jun NH2-terminal kinase (JNK)* y *Rac/p38*, que culminan en la proliferación y diferenciación celular (Comalada et al., 2012; Kyriakis et al., 1992; Lloberas et al., 2016).

Activación de los macrófagos

Los macrófagos presentan una gran heterogeneidad fenotípica dependiendo del microambiente en el que se encuentren (Akagawa, 2002a; Akagawa et al., 2006a). Durante la respuesta inflamatoria participan las dos poblaciones mayoritarias de macrófagos. Los macrófagos proinflamatorios activados por la vía clásica (M1), que participan durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria, y los antiinflamatorios activados por la vía alternativa (M2) que intervienen en la reparación de los tejidos dañados y en la resolución (Figura 2) (Mantovani et al., 2002; Valledor et al., 1998). No obstante, una actividad

excesiva por parte de los macrófagos proinflamatorios o antiinflamatorios puede ocasionar daño tisular y enfermedades crónicas (Figura 5) (Laskin et al., 2011).

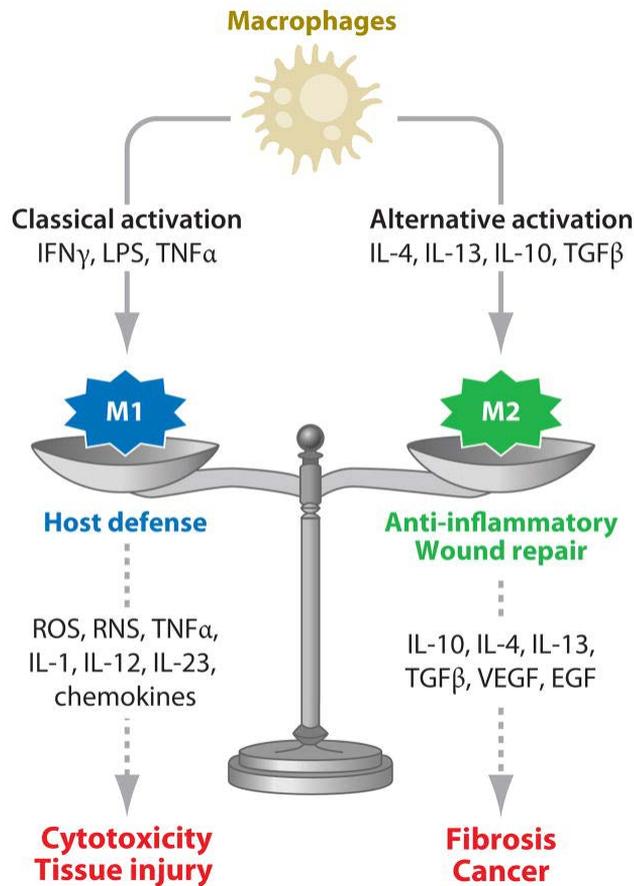


Figura 5. Rol de los macrófagos activados por la vía clásica (M1) o alternativa (M2) en el daño y en la reparación tisular. EGF, *epidermal growth factor*; IFN γ , interferón- γ ; IL, interleucina; LPS, lipopolisacárido; RNS, especie reactiva de nitrógeno; ROS, especie reactiva de oxígeno; TGF β , *transforming growth factor β* ; TNF α , *tumor necrosis factor α* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor* (Laskin et al., 2011).

En los ensayos *in vitro*, los macrófagos pueden ser activados mediante el uso de citocinas de tipo T *helper* 1 (Th1) como el interferón (IFN)- γ , o productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, a fin de obtener macrófagos proinflamatorios. Éstos producen una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) y enzimas

proteolíticas. Por otro lado, los macrófagos activados con citocinas de tipo Th2, como la interleucina (IL)-4 o la IL-10 presentan un perfil antiinflamatorio y participan en la reparación de los tejidos dañados (Mantovani et al., 2013; Shapouri-Moghaddam et al., 2018a). Así pues, los macrófagos pueden ser activados mediante distintas citocinas ya que poseen los receptores correspondientes, como el receptor de IFN- γ (IFNGR), IL-4 (IL-4R) o IL-10 (IL-10R) (Murray et al., 2014).

La actividad de los macrófagos es crítica no solo en la defensa frente a los patógenos invasores, sino también en el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Estas células actúan como sensores, por lo que tras el reconocimiento son capaces de iniciar la respuesta inmunitaria a través de la producción de mediadores proinflamatorios. Así pues, los macrófagos expresan receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors*, PRRs), que reconocen moléculas simples exógenas o PAMPs que son comunes en la mayoría de los microorganismos y no están presentes en el huésped. La mayoría de los PAMPs son ácidos nucleicos, lipoproteínas y componentes de la membrana como el LPS. Algunos PRRs son proteínas transmembrana, como los receptores de tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLRs). Otros son proteínas citoplasmáticas, como los receptores de tipo NOD (*NOD-like receptors*, NLRs) y los receptores de tipo RIG-I (*RIG-I-like receptors*, RLRs). Por otro lado, los macrófagos a través de los PRRs también pueden reconocer moléculas endógenas que indiquen daño o estrés, conocidas como moléculas o patrones asociados a peligro (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs). Forman parte de los DAMPs algunas proteínas, como las de alta movilidad del grupo de la caja 1 (*High mobility group box 1*, HMGB1) y las de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP). Otros ejemplos de DAMPs no proteicos son el trifosfato de adenosina (ATP), el ácido úrico y los ácidos nucleicos (Mosser and Edwards, 2008; Tang et al., 2012; Zhang and Mosser, 2008). A continuación, se explica de forma más detallada algunos de los activadores proinflamatorios de los macrófagos.

▪ **Los interferones y sus receptores**

La producción de los interferones (IFNs) se origina como parte de la respuesta antivírica o antimicrobiana. Pueden inhibir directamente la replicación vírica a través de la expresión de genes estimulados por interferón (*interferon stimulated genes*, ISGs) y aumentar la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. También inducen la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*, MHC) de clase I y II. Además, favorecen el reclutamiento de los leucocitos al foco inflamatorio, ya que inducen la expresión de moléculas de adhesión vasculares y la producción de quimiocinas. Por otro lado, los IFNs participan en la activación de la citotoxicidad de las células del sistema inmunitario innato y de las del adaptativo (células NK o *natural killers*, células dendríticas, macrófagos y linfocitos T). Hoy en día la familia de los IFNs está agrupada en tres tipos: I, II y el III (Borden et al., 2007).

Los IFNs de tipo I incluyen 19 moléculas: 15 IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- ϵ y IFN- κ . Éstos presentan diferencias cualitativas y cuantitativas respecto a sus acciones. Los IFN- α y IFN- β , producidos por los macrófagos y los fibroblastos respectivamente, inducen un estado antiviral en la mayoría de las células nucleadas, inducen la expresión de MHC de clase I y activan a las células NK (Borden et al., 2007; Price et al., 2000).

El receptor de IFN de tipo I está formado por dos proteínas transmembranales, el receptor de IFN- α de tipo I (IFNAR1) y de tipo II (IFNAR2). El IFNAR1 está asociado a la Tirosina quinasa 2 (TYK2) y el IFNAR2 a la Janus quinasa 1 (JAK1). Así pues, cuando el ligando se une al receptor, TYK2 y JAK1 se autofosforilan y transfosforilan, favoreciendo el reclutamiento del transductor de señal y activador de la transcripción 1 (*signal transducer and activator of transcription 1*, STAT1) y de STAT2. Al interactuar con las quinasas se fosforilan en sus dominios tirosina 701 y 690 respectivamente, y conforman un hererodímero capaz de asociarse al factor regulador del interferón 9 (IRF9). Éste se conoce como el factor estimulador de genes 3 (ISGF3), el cual es capaz de migrar al núcleo y actuar como factor de transcripción uniéndose a secuencias

ISRE (*interferon stimulated response element*) de los ISGs (Figura 6) (Borden et al., 2007; Murphy and Weaver, 2017).

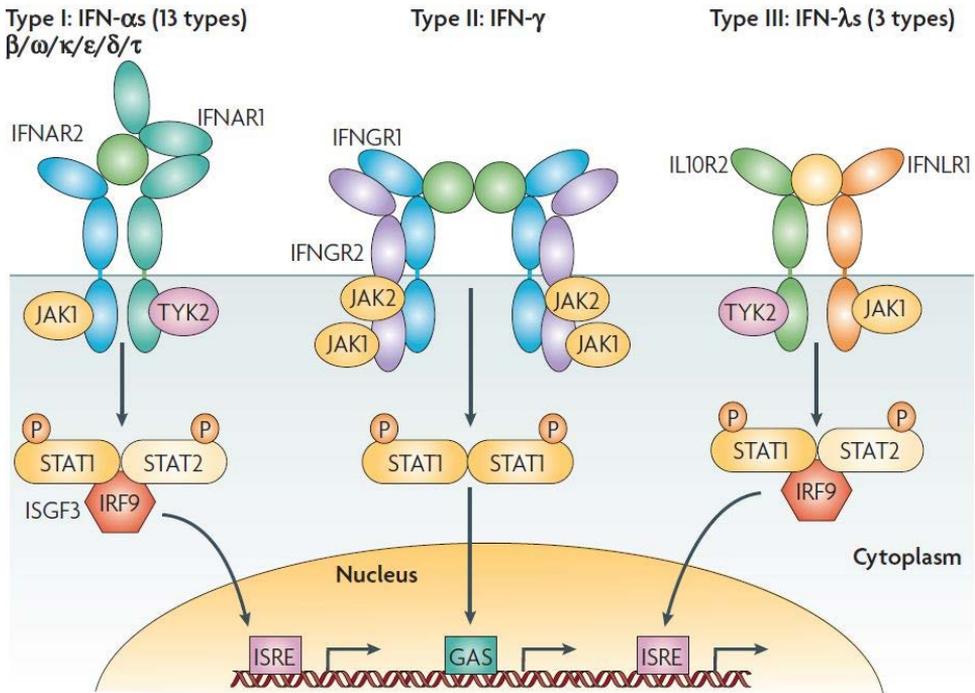


Figura 6. Los interferones de tipo I, II y III y sus receptores. Representación de los receptores de los IFNs, sus ligandos y de las vías de señalización correspondientes (Borden et al., 2007).

Respecto a los IFNs de tipo II solamente existe un tipo, el IFN-γ producido por las células NK y por los linfocitos Th1 y CD8⁺. Éste induce un estado antiviral inhibiendo la replicación de una gran variedad de virus, activa a los macrófagos, induce la expresión moléculas MHC de clase I y II, activa al sistema inmunitario adaptativo aumentando la presentación de antígeno y está involucrado en varios procesos inmunoreguladores: cambio de isotipo (*switching*) de los linfocitos B a ciertas clases de IgG o inhibición del desarrollo de ciertas poblaciones de linfocitos Th. En términos generales actúa de vínculo entre la inmunidad innata y la adaptativa (Price et al., 2000; Schroder et al., 2004; Valledor et al., 2008).

El receptor de IFN de tipo II está compuesto por el receptor de IFN-γ de tipo I (IFNGR1) y II (IFNGR2). El IFNGR1 está asociado a JAK1 y el IFNGR2 a JAK2.

Cuando el IFN- γ se une al receptor, JAK1 y JAK2 se autofosforilan y transfosforilan, favoreciendo el reclutamiento de STAT1. Al interactuar con las quinasas se fosforila en su dominio tirosina 701 y forma un homodímero. Éste es capaz de migrar al núcleo y actuar como factor de transcripción uniéndose a secuencias GAS (*gamma-activated site*) induciendo la expresión de los ISGs (Figura 6) (Borden et al., 2007; Murphy and Weaver, 2017).

Los IFNs de tipo III engloban 3 tipos de IFN- λ . Éstos tienen un papel importante en la protección de las superficies epiteliales frente a virus (Ank et al., 2006; Wack et al., 2015). Además, se activan por la misma vía de señalización que los IFNs de tipo I pero a través de un receptor distinto. El receptor de IFN de tipo III es un heterodímero formado por el receptor IFN- λ de tipo 1 (IFNLR1 o IL28RA) y el receptor de IL-10 de tipo 2 (IL10R2 o IL10RB). El IFNLR1 está asociado a TYK2 y el IL10R2 a JAK1. Cuando el IFN- λ se une al receptor induce la expresión de ISGs a través de la misma vía que los IFNs de tipo I (Figura 6) (Borden et al., 2007).

▪ **LPS y TLR4**

El LPS es el componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Se trata de una macromolécula de 10-20kDa formada por tres componentes. El lípido A (endotoxina), un núcleo formado por oligosacáridos y el O-antígeno (oligosacáridos específicos en cada serotipo bacteriano). Además, aunque el LPS forma parte de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, durante las infecciones éste se puede encontrar de manera soluble en el suero.

El receptor del LPS incluye el TLR4 y las proteínas accesorias CD14 y MD-2. Éste solamente se expresa en algunas células del sistema inmunitario, como es el caso de los macrófagos. El LPS en el suero se une a la proteína de unión al LPS (*LPS binding protein*, LBP), permitiendo la unión al CD14, una proteína de membrana. Por otro lado, MD-2 se une al dominio extracelular del TLR4, completando así el complejo que forma el receptor del LPS (Figura 7).

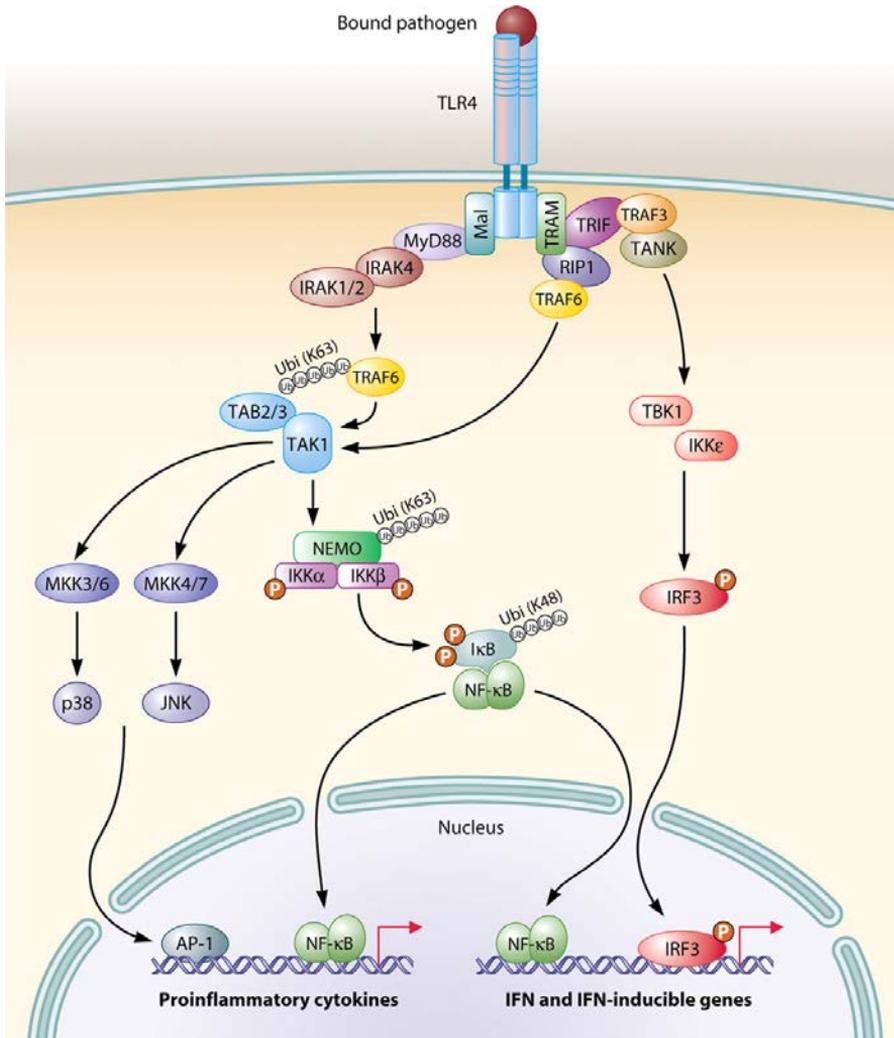


Figura 7. Señalización del complejo LPS-TLR4. El complejo TLR4 activa las vías de señalización dependientes de MyD88 o TRIF, que activan la expresión de genes proinflamatorios y de IFNs de tipo I (Mogensen, 2009).

Cuando el LPS se une a su receptor, se induce la homodimerización del TLR4, permitiendo la interacción de sus dominios intracelulares TIR. A continuación, tiene lugar el reclutamiento de las moléculas adaptadoras con dominios TIR: el factor de diferenciación mieloide 88 (*Myeloid differentiation factor 88*, MyD88), la proteína adaptadora que contiene dominio TIR (*TIR-domain containing adapter protein*, TIRAP o *MyD88-adaptor-like*, Mal), el adaptador que contiene dominio

TIR inductor de IFN- β (*TIR-domain-containing adapter inducing interferon- β* , TRIF) y la molécula adaptadora asociada a TRIF (*TRIF-related adapter molecule*, TRAM). Así pues, existen dos vías de señalización iniciadas por el TL4. La vía dependiente de MyD88 (TIRAP-MyD88), que activa la expresión de los genes proinflamatorios y una vía dependiente de TRIF (TRIF-TRAM), que activa la expresión de IFNs de tipo I (Murphy and Weaver, 2017; O'Neill et al., 2013; Vaure and Liu, 2014).

La vía dependiente de MyD88 se inicia mediante el reclutamiento de la proteína quinasa asociada a IL-1R 4 (*IL-1-receptor associated kinase 4*, IRAK4) y de IRAK1/2. A continuación IRAK se autofosforila y se asocia con el factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*, TRAF6). Este es una ligasa de ubiquitina (E3), la cual añade cadenas proteicas poliubiquitinizadas sobre la serina-treonina quinasa 1 (*serine-threonine Kinase*, TAK1) y en el complejo quinasa I κ B (IKK o *NF κ B essential modifier*, NEMO) permitiendo su aproximación. Por un lado, TAK1 activa al complejo quinasa I κ B (IKK o *NF κ B essential modifier*, NEMO), compuesto por IKK α , IKK β , y IKK γ . Seguidamente IKK fosforila al inhibidor de κ B (*inhibitor of κ B*, I κ B) unido al factor nuclear κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF κ B) en el citoplasma, induciendo la degradación de I κ B. Así al factor NF κ B es capaz de migrar al núcleo, donde induce la transcripción de genes proinflamatorios como *TNF- α* , *IL-1 β* , e *IL-6*. Por otro lado, TAK también activa a miembros de la familia MAPK, como JNK y p38. Esta vía culmina en la activación del factor de transcripción de la proteína activadora 1 (*transcription factor activator protein 1*, AP1), que induce la expresión de genes proinflamatorios (Akira and Takeda, 2004; Lu et al., 2008; Mills, 2011).

La vía dependiente de TRIF se inicia mediante el reclutamiento y la activación de la proteína que interacciona con el receptor 1 (*receptor-interacting protein 1*, RIP1). Seguidamente RIP1 puede activar las diferentes cascadas de señalización que implican a las MAPKs y a NF κ B. Por otro lado TRIF, asociada a TRAM, también recluta a TRAF3 y *TRAF family membrane-associated NF κ B activator* (TANK), que activan a la quinasa 1 de unión a TANK (*Tank-binding kinase 1*, TBK1) e IKK ϵ . Consecuentemente, se produce la fosforilación y

activación del factor regulador de interferón 3 (IRF3), que es capaz de migrar al núcleo y activar el factor de transcripción de IFN de tipo I (Akira and Takeda, 2004; Lu et al., 2008; Mills, 2011).

▪ **Señalización de los ácidos nucleicos**

La estructura molecular básica del ácido desoxirribonucleico (ADN) y del ácido ribonucleico (ARN) es universal. Sin embargo, dependiendo de la disponibilidad, la localización y la estructura, las células son capaces de distinguir lo propio de lo foráneo. Para ello disponen de una serie de sensores capaces de reconocer ácidos nucleicos intracelulares e inducir una respuesta efectora adecuada. Éstos incluyen receptores de tipo PRRs, como los TLRs del endosoma (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9), y otros sensores situados en el citoplasma como los RLRs, que incluyen sensores de ARN como *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) y *melanoma differentiation associated gene 5* (MDA5 o IFIH1), y también podemos encontrar receptores de ADN como el *absent in melanoma 2* (AIM2) y la sintasa de GMP-AMP cíclico (cGAS). Estos PRRs son capaces de activar vías de señalización, donde participan los factores de transcripción NFκB e IRF3, induciendo una respuesta antivírica mediada por IFN de tipo I y la expresión de genes ISGs. Por otro lado, las células disponen de otro grupo de sensores capaces de ejercer directamente la actividad antivírica a través de modificaciones o degradando los ácidos nucleicos. Este grupo incluye proteínas como (*dsRNA*)- *activated protein kinase R* (PKR), *2'-5'-oligoadenylate synthetase 1* (OAS1) y *adenosine deaminase acting on RNA 1* (ADAR1 o ADAR). Además, hay proteínas capaces de ejercer funciones antivíricas y a su vez inducir una respuesta antivírica, como es el caso de RIG-I. Ésta proteína puede inducir una respuesta antivírica de IFN de tipo I y unirse al RNA interfiriendo su unión a polimerasas (Figura 8) (Desmet and Ishii, 2012; Schlee and Hartmann, 2016).

No obstante, se han identificado distintas alteraciones genéticas que pueden aumentar o disminuir la función de algunos sensores de ácidos nucleicos, DNasas, RNasas y enzimas que modifiquen los ácidos nucleicos. Como consecuencia pueden producirse alteraciones en el reconocimiento de los ácidos

nucleicos propios y foráneos causando algunas patologías. Por lo que existen distintas enfermedades autoinmunitarias debidas a mutaciones en proteínas que participan en el reconocimiento o en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Algunos ejemplos son el síndrome de Aicardi-Goutières (AGS), el síndrome Singleton-Merten y la vasculopatía asociada al *Stimulator of Interferon Genes* (STING) (Rodero and Crow, 2016).

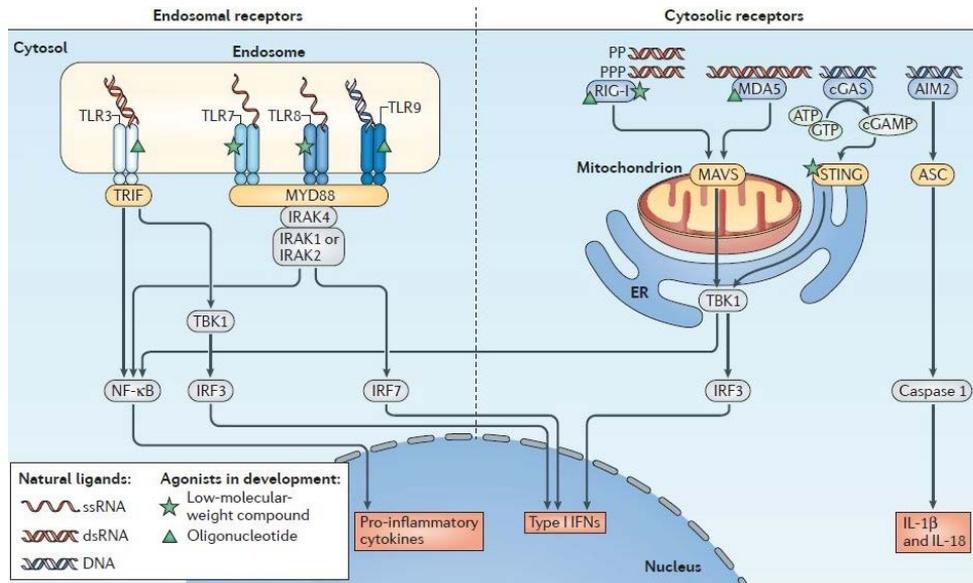


Figura 8. Resumen de las vías de señalización de ácidos nucleicos en el endosoma y en el citosol. Se muestran los sensores de ácidos (azul), las moléculas adaptadoras (amarillo), y las moléculas de señalización *downstream* (gris). La activación de las vías induce la producción de IFN y de otras citocinas (rojo) (Figura adaptada de Junt and Barchet, 2015).

EL DAÑO EN EL ADN

El ADN contiene la información genética de los seres vivos, por lo que su integridad y estabilidad es esencial para la vida. No obstante, el ADN puede dañarse al estar expuesto a agentes endógenos, como el estrés oxidativo y los errores producidos durante la replicación del ADN, o por agentes exógenos, como la luz ultravioleta (UV) y las radiaciones ionizantes (IR). Existen diferentes tipos de lesiones según el agente que las cause: daño de las bases (oxidación,

alquilación, hidrólisis y errores), roturas monocatenarias (*single strand break*, SSB) o bicatenarias (*double strand break*, DSB) y entrecruzamientos intracadena. El SSB es una de las formas más comunes de daño en el ADN, mientras que el DSB es la lesión más citotóxica. Frente a estas lesiones las células han desarrollado diferentes mecanismos de reparación del ADN: *DNA base excision repair* (BER), *single strand break repair* (SSBR), *nucleotide excision repair* (NER), *mismatch repair* (MMR), *homologous recombination* (HR) y *Non-homologous end joining* (NHEJ) (Figura 9).

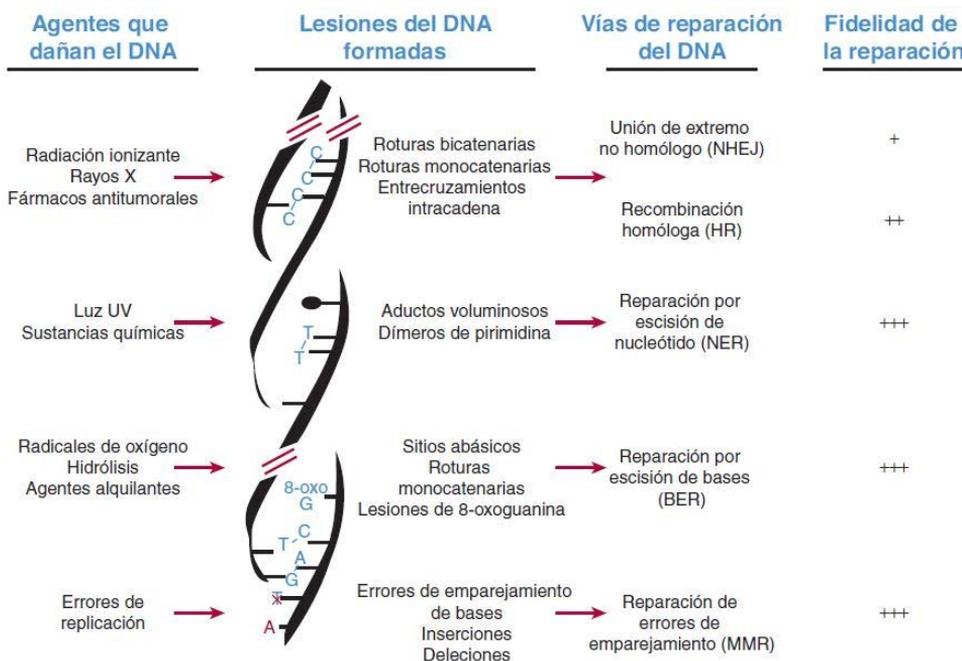


Figura 9. Agentes que dañan el ADN, tipo de lesiones y las vías de reparación. Resumen de la respuesta al daño en el ADN en las células (Murray and Harper, 2013).

Sin embargo, si el ADN dañado no se repara, pueden establecerse mutaciones que ocasionalmente derivan en algún tipo de patología. Además, se ha visto que cuando están alterados los mecanismos que confieren estabilidad al ADN, aumenta la susceptibilidad a padecer cáncer y enfermedades de origen genético. También afecta al funcionamiento del sistema inmunitario debido a la reorganización de los genes de las inmunoglobulinas y de los receptores de los linfocitos T (Waters, 2006).

Respuesta al daño en el ADN

En la respuesta al daño en el ADN, con el fin de mantener la integridad genómica, las proteínas *Ataxia-telangiectasia-mutated* (ATM) y *ataxia telangiectasia and Rad3-related* (ATR) son esenciales. Estas proteínas son capaces de inducir vías de reparación del ADN y paradas en los puntos de control del ciclo celular. Se han descrito mutaciones en los genes *ATM* y *ATR* que originan las alteraciones genéticas como la ataxia-telangiectasia (AT) y el síndrome Seckel (SCKL) respectivamente. La AT afecta al sistema nervioso y al inmunitario entre otros, por lo que las personas afectadas suelen presentar inmunodeficiencia, más susceptibilidad a padecer cáncer y son muy sensibles a las radiaciones (Lavin, 2008). Por otro lado, el SCKL provoca retraso en el crecimiento intrauterino y postnatal, microcefalia y retraso mental (O'Driscoll et al., 2003).

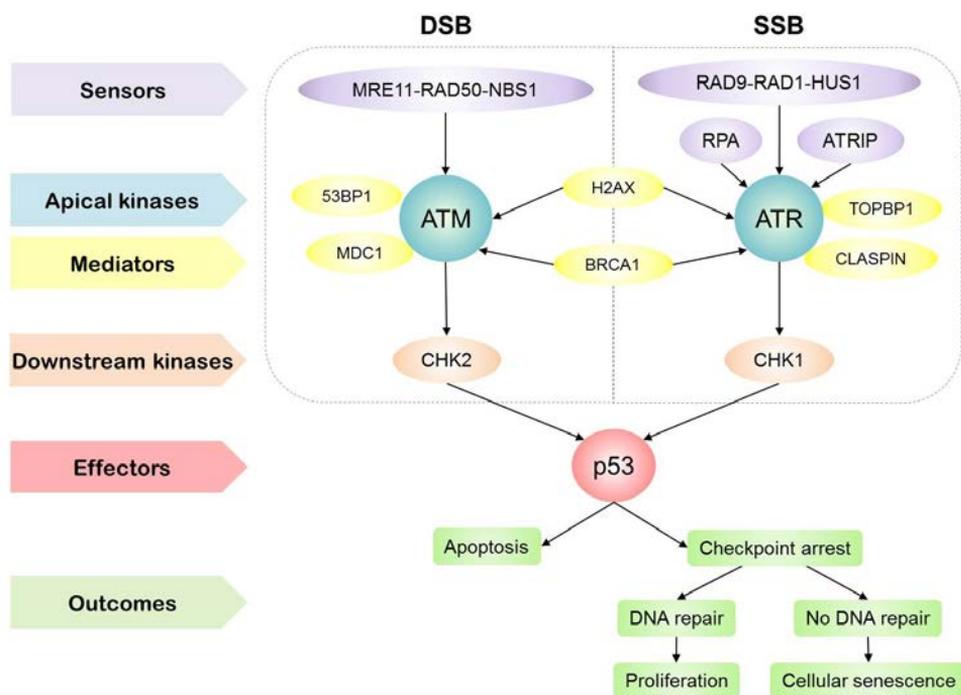


Figura 10. La respuesta al daño en el ADN. Resumen de la respuesta al daño en el ADN por rotura de doble cadena (DSB) o monocatenaria (SSB) mediadas por las proteínas ATM y ATR (Figura adaptada de Sulli et al., 2012).

Las proteínas ATM y ATR son quinasas, de 351 y 301 kDa respectivamente, miembros de la familia *phosphatidylinositol 3-kinase related kinases* (PIKKs). Cuando se producen roturas en el ADN de doble cadena (DSB), el complejo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) lo detecta e inicia la vía de señalización ATM/Serina-treonina quinasa (CHK) 2. Por otro lado, cuando se producen roturas monocatenarias (SSB), el complejo RAD9-RAD1-HUS1 (RRH), la proteína de replicación A (RPA) y *ATR-interacting protein* (ATRIP) son los sensores que reconocen el daño en el ADN e inician la vía ATR/CHK1. No obstante, en ambos casos la vía culmina en la activación de la proteína supresora de tumores p53. De modo que tanto ATM como ATR, en función del tipo de daño en el ADN, pueden inducir paradas en los puntos de control del ciclo celular facilitando la reparación del ADN. En los casos en los que el daño es irreparable se induce la apoptosis celular (Figura 10) (Abraham, 2001; Blackford and Jackson, 2017; Sulli et al., 2012).

Puntos de control en el ciclo celular

El ciclo celular permite a la célula prepararse para su división y consiste en la sucesión de cuatro acontecimientos secuenciales: fase G1 (incremento de tamaño), fase S (síntesis del ADN), fase G2 (preparación para la división) y fase M (mitosis). Además, las células pueden entrar en la fase G0 (estado quiescente). La progresión del ciclo celular está regulada por los complejos activados formados por las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y las ciclinas. Los niveles de CDKs son constantes, pero solo son activas cuando están unidas a ciclinas, cuya expresión fluctúa a lo largo del ciclo celular. El complejo CDK-ciclina también puede inhibirse por fosforilación o por proteínas que impidan la formación de éste (Lim and Kaldis, 2013). Así pues, la célula dispone de varios mecanismos que le permiten parar el ciclo celular en distintos puntos de control, permitiendo la reparación del ADN dañado (Figura 11) (Barnum and O'Connell, 2014).

El punto de control G1/S inhibe la replicación celular, evitando que la célula con daño en su ADN pueda entrar en la fase S. Cuando el daño aparece durante la replicación del ADN o no se ha detectado en el punto de control G1/S, tiene

lugar el punto de control intra-S. Éste evita la aparición de orígenes de replicación. Asimismo, si la célula no supera el punto de control G2/M se impide la progresión del ciclo celular impidiendo su entrada en la fase mitótica. Así pues, tras sufrir daño en el ADN se induce la activación de las vías de señalización mediadas por ATM/CHK2 o ATR/CHK1, según si el daño es DSB o SSB respectivamente. Estas vías culminan en distintas proteínas efectoras como por ejemplo el inhibidor $p21^{waf-1}$, diana de p53, encargado de pausar el ciclo celular en la interfase G1/S. Finalmente, si el ADN no se repara el ciclo celular permanece parado y la célula entra en senescencia o apoptosis (Xaus et al., 2001).

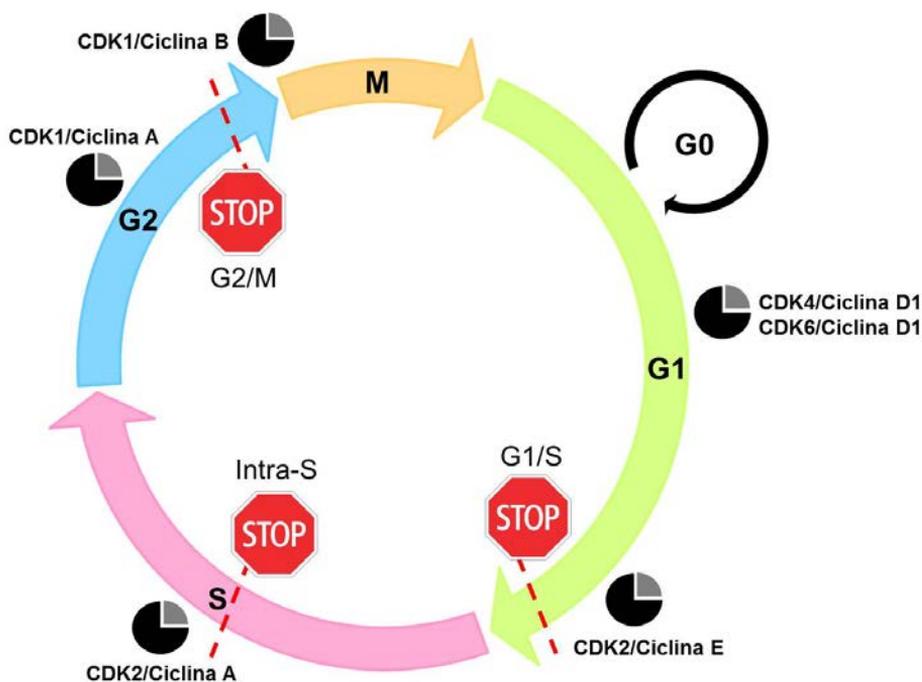


Figura 11. Esquema del ciclo celular y las principales proteínas implicadas en su regulación. En la figura se muestran los puntos de control donde tiene lugar la reparación del ADN dañado (Figura adaptada de Serra et al., 2009).

Los macrófagos y el daño en el ADN

Durante la inflamación los neutrófilos y los macrófagos producen grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS). Se

trata del estallido respiratorio, un mecanismo de defensa mediante el cual se producen metabolitos tóxicos necesarios para destruir al patógeno y llevar a cabo la respuesta inflamatoria.

Dependiendo de la concentración de las ROS intracelulares, pueden ejercer como moléculas de señalización o como mediadores proinflamatorios. Así pues, cuando los niveles de las ROS son elevados oxidan proteínas, constituyentes celulares lipídicos y dañan el ADN. Sin embargo, cuando la concentración de éstas es menor, actúan como moléculas de señalización en distintos procesos celulares, como por ejemplo durante el crecimiento celular, adhesión, senescencia o la apoptosis (Figura 12) (Nathan and Cunningham-Bussel, 2013).

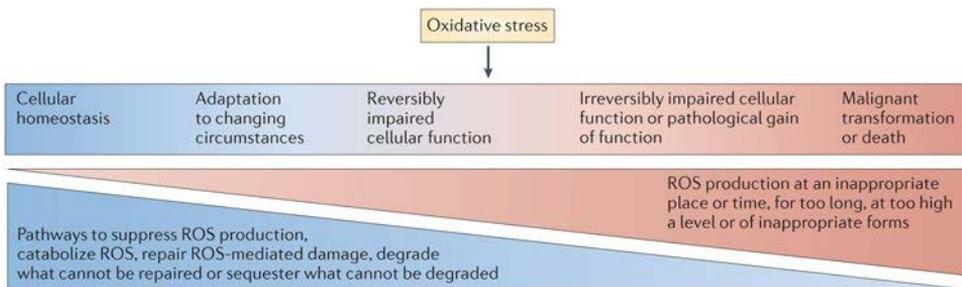


Figura 12. La señalización de las ROS depende de su concentración. La producción de las ROS cuando está limitada a nivel local, temporal, cantidad y tipo de especies producidas, contribuyen en la homeostasis celular. Si la producción no está limitada las ROS causan daños, en ocasiones irreparables induciendo la muerte celular (Nathan and Cunningham-Bussel, 2013).

Durante la respuesta inflamatoria los neutrófilos, con una vida media reducida, participan en la fase más temprana. Sin embargo, los macrófagos con una vida media mayor continúan generando ROS y RNS durante un periodo de tiempo más largo. A través de la NADH oxidasa los macrófagos son capaces de generar grandes cantidades de anión superóxido (O_2^-), el cual es convertido mediante la superóxido dismutasa (SOD) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Por otro lado, también producen grandes cantidades de ROS mediante la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias (Mittal et al., 2013).

La respuesta inflamatoria culmina cuando se remueve el agente inductor y se reparan los tejidos dañados. Sin embargo, en la inflamación crónica la

producción de las ROS no cesa, por lo que se propicia un ambiente oxidativo altamente tóxico capaz de dañar diferentes macromoléculas como el ADN. Se ha visto que los monocitos, descendientes de los macrófagos, son muy sensibles a las ROS (Ponath and Kaina, 2017a). Sin embargo, los macrófagos y los neutrófilos son células muy resistentes pese a estar muy expuestos a los efectos dañinos de las ROS que éstos producen. En el caso de los macrófagos, al activarse también se inducen una serie de mecanismos de reparación para protegerse de las roturas del ADN causadas por las ROS durante la inflamación (Figura 13) (Colonna, 2015; Pereira-Lopes et al., 2015a).

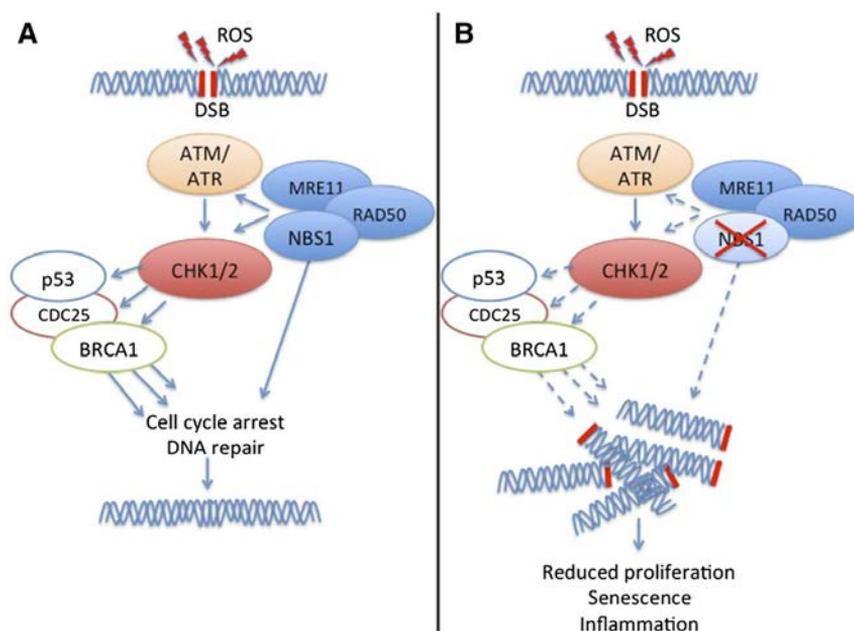


Figura 13. Nbs1 controla las funciones de los macrófagos. (A) Las ROS inducen DSBs que activan la DDR donde participan las quinasas ATM, ATR, CHK1, CHK2 y otras proteínas como p53, Cdc25 y BRCA1. El complejo formado por NBS1, MRE11 y RAD50 facilita la DDR. (B) Un déficit de NBS1 en los macrófagos resulta en la acumulación de DSBs y consecuentemente disminuye la proliferación, se acelera la senescencia y aumenta la secreción de citocinas proinflamatorias. ROS, especies reactivas de oxígeno; DSB, rotura en el ADN de doble cadena; DDR, respuesta al daño en el ADN (Colonna, 2015).

EL SÍNDROME DE AICARDI-GOUTIÈRES Y LAS INTERFERONOPATIAS DE TIPO I

Los IFNs de tipo I (o IFN- α y β) proporcionan un estado antivírico al organismo. Inducen la expresión de los ISGs en las células infectadas y en las colindantes, la presentación antigénica y la producción de citocinas en las células del sistema inmunitario innato, la producción de anticuerpos y la respuesta efectora mediada por los linfocitos T. De este modo, el organismo es capaz de restringir la replicación vírica y modular la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Así pues, la desregulación de la vía de señalización mediada por los IFNs de tipo I causa la pérdida de la homeostasis del sistema inmunitario, derivando en distintas patologías (Ivashkiv and Donlin, 2014).

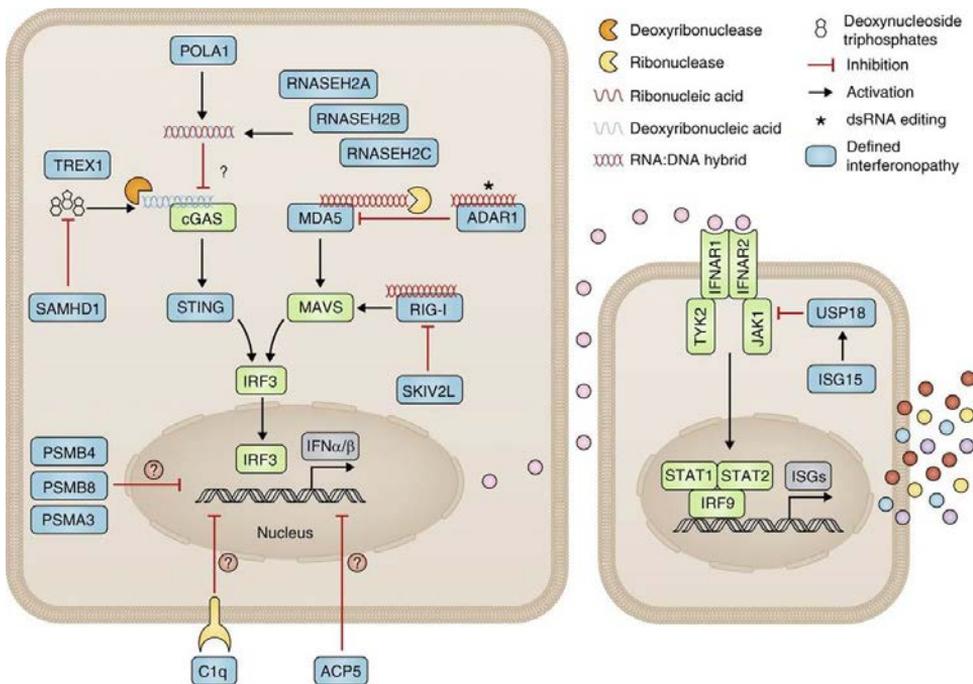


Figura 14. Señalización mediada por IFN de tipo I y las interferonopatías de tipo I. Enfermedades monogénicas consideradas como interferonopatías de tipo I (caja azul) (Rodero and Crow, 2016).

Existe un grupo heterogéneo de enfermedades monogénicas que tienen en común la sobreactivación constitutiva de las vías de señalización mediadas por

los IFNs de tipo I en ausencia de virus. Estas enfermedades se clasifican como interferonopatías de tipo I (Figura 14). Se han descrito distintos mecanismos que las originan: (I) la estimulación inapropiada de la respuesta, por la acumulación o cambios en la composición de los ácidos nucleicos endógenos en el citosol; (II) el aumento de la sensibilidad a los ácidos nucleicos, ya sea por defectos en los sensores o en las moléculas adaptadoras que participan en la vía de señalización de los ácidos nucleicos; (III) defectos en la regulación negativa de la respuesta mediada por IFNs de tipo I (Lee-Kirsch, 2017; Rodero and Crow, 2016).

El síndrome de Aicardi-Goutières (AGS) se describió por primera vez en el año 1984 por los neurólogos infantiles Jean Aicardi y Françoise Goutières, como una enfermedad progresiva que afecta al cerebro debido a un incremento de los leucocitos en el sistema nervioso central (CNS) (Aicardi and Goutières, 1984). Las personas afectadas tienen un nivel elevado de IFN- α en el líquido cefalorraquídeo y en el suero. Así pues, esta enfermedad mimetiza a una infección vírica congénita, a pesar de no detectar virus en ninguno de los casos estudiados. Actualmente, gracias al estudio de distintos biomarcadores moleculares, el AGS se considera una interferonopatía de tipo I. (Rodero and Crow, 2016). Se ha identificado la sobreexpresión de 23 citoquinas en el CNS, donde 11 también se hallan en niveles elevados en el plasma (Takanohashi et al., 2013). Así pues, a través de muestras de sangre se podría diagnosticar el AGS y monitorizar a los pacientes durante el desarrollo de la enfermedad. Otros biomarcadores del AGS son los autoanticuerpos, propios de las enfermedades autoinmunes, de los cuales algunos son únicos en el AGS. Éstos tienen como diana a las células endoteliales y a los atrociitos en el cerebro (Cuadrado et al., 2015). Hasta el momento el biomarcador más fuerte y homogéneo durante el desarrollo de la enfermedad es el incremento en la expresión de ISGs en sangre periférica (Rice et al., 2013a). Los síntomas del AGS suelen aparecer durante el primer año de vida y en la mayoría de los casos el desarrollo previo es normal. En ocasiones estos síntomas aparecen tras la vacunación. No obstante, aún no se conocen los detonantes de la aparición de la enfermedad, aunque todo apunta a que podría deberse a un factor exógeno y/o al propio *background*

genético del individuo. Así pues, los biomarcadores moleculares descritos en el AGS podrían servir para diagnosticar con antelación la aparición de la enfermedad y evitar su inicio mediante tratamientos. El AGS mayoritariamente afecta al cerebro y a la piel, por lo que los pacientes presentan calcificaciones intracraneales y sabañones en los pies. Con menor frecuencia, el AGS está relacionado con la aparición de glaucomas, hipotiroidismo, cardiomiopatía, inflamación gastrointestinal y diabetes insípida. Incluso se han hallado pacientes que además padecen otras enfermedades autoinmunes, como por ejemplo el lupus eritematoso sistémico (SLE) y el síndrome linfoproliferativo autoinmune (APLS) (Crow et al., 2015; Rice et al., 2007).

En los últimos años se han identificado mutaciones en distintos genes que causan el AGS: *TREX1*, *RNasa H2* (Subunidades A, B y C), *SAMHD1*, *ADAR* e *IFIH1* (Figura 15). Todos estos genes codifican proteínas que participan en la señalización y en el procesamiento de los ácidos nucleicos. *TREX1* y el complejo *RNasa H2* son nucleasas que degradan el ADN monocatenario y bicatenario, y los híbridos de ADN:ARN respectivamente. *SAMHD1* es una fosfohidrolasa y nucleasa que participa en la regulación del *pool* de desoxinucleotidos (dNTPs) en el citosol. Por último, *ADAR* es una enzima que edita el ARN bicatenario y *IFIH1* (o *MDA5*) es un receptor citoplasmático del ARN bicatenario.

Normalmente el AGS es de herencia autosómica recesiva, aunque se han identificado mutaciones de *novo* o de herencia autosómica dominante (Crow et al., 2015). Las mutaciones que causan el AGS suelen provocar la pérdida de la función de las proteínas. No obstante, se han descrito algunas mutaciones en los genes *TREX1* y *ADAR*, y todas las encontradas en el gen *IFIH1* que implican un incremento en sus funciones. La pérdida total de las actividades enzimáticas de *TREX1* o *SAMHD1* es compatible con la vida. Sin embargo, nunca se han descrito mutaciones bialélicas en los genes que codifican para las subunidades del complejo *RNasa H2* y *ADAR* (Crow et al., 2015).

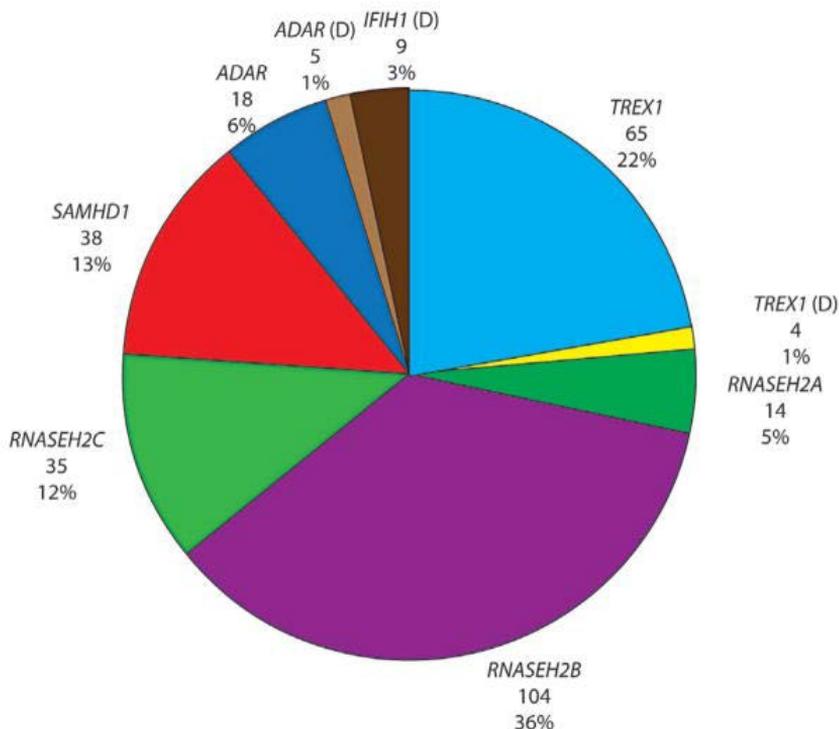


Figura 15. Mutaciones en TREX1, RNASEH2 (A, B y C), SAMHD1, ADAR y IFIH1 asociadas a AGS. En el gráfico se muestra el número y el porcentaje de las familias afectadas estudiadas. D, indica mutación dominante (Crow et al., 2015).

En los últimos años los modelos de ratón se han convertido en una herramienta indispensable para estudiar las mutaciones que causan el AGS. En especial, el modelo de ratón deficiente en TREX1 ha sido extensamente estudiado para comprender la enfermedad en humanos. Estos ratones padecen autoinmunidad, por lo que tienen una supervivencia reducida al desarrollar miocarditis inflamatoria. Sin embargo, no presentan el fenotipo neurológico característico en los pacientes con el AGS (Morita et al., 2004a). No obstante, el modelo de ratón deficiente en la exonucleasa TREX1 ha desvelado algunas incógnitas que abarcan esta enfermedad.

El origen de los ácidos nucleicos en el AGS

El AGS es una alteración inflamatoria asociada a la inducción de la respuesta inmunitaria innata mediada por los IFNs de tipo I. Además, las proteínas relacionadas con el AGS participan en la señalización y en el procesamiento de los ácidos nucleicos. Así pues, si estas proteínas no funcionan correctamente pueden verse afectadas las vías de señalización inducidas por los ácidos nucleicos. Por lo tanto, los ácidos nucleicos endógenos podrían inducir la respuesta inmunitaria innata tal y como ocurre en presencia de ácidos nucleicos exógenos. No obstante, no se sabe con certeza el origen de los ácidos nucleicos que inducen la respuesta patológica en el AGS. Actualmente existen dos teorías mayoritarias que relacionan el origen de éstos con el daño en el ADN o con el procesamiento de los retrotransposones. El modelo de ratón deficiente en TREX1 ha sido una gran herramienta para esclarecer ambas teorías (Morita et al., 2004a).

En el año 2007 se determinó que las células deficientes en TREX1 presentan de manera constitutiva daño crónico en el ADN, debido a la acumulación de ADN monocatenario endógeno (Yang et al., 2007). Así pues, la exonucleasa TREX1 podría tener un papel clave en la reparación del ADN dañado. Además, otras proteínas relacionadas con el AGS también participan en los procesos de reparación del ADN, como son SAMHD1 y el complejo RNasa H2 (Daddacha et al., 2017; Hiller et al., 2012). Por lo tanto, el déficit en la función de las proteínas asociadas al AGS podría favorecer la acumulación de daño en el ADN debido al funcionamiento incorrecto de los mecanismos de reparación durante la replicación del ADN (Figura 16).

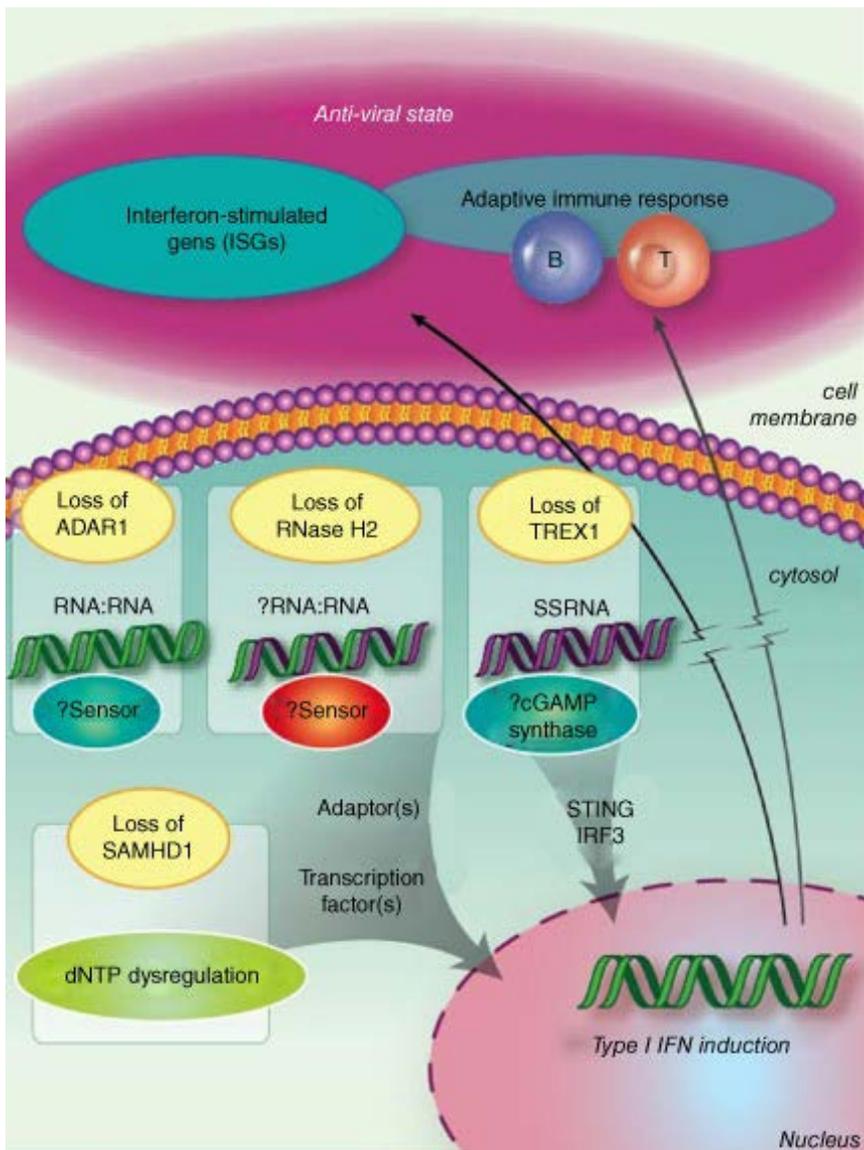


Figura 16. Acumulación de los ácidos nucleicos endógenos por la pérdida de la función de proteínas relacionadas con el AGS. La acumulación de ADN endógeno es detectada por el sistema inmunitario innato (Crow et al., 2014).

Un año después, en 2008, se sugirió por primera vez el rol de los ácidos nucleicos endógenos derivados de retrovirus en la patogénesis del AGS. Los retrotransposones forman parte de más de la mitad del genoma humano, aunque la mayoría están silenciados mediante mecanismos epigenéticos que

previenen su transcripción. Así pues, los retrotransposones mantienen su actividad a niveles muy bajos en la mayoría de las células. Se determinó que las células deficientes en TREX1 acumulan más retrotransposones endógenos. Por lo cual, TREX1 podría participar en el metabolismo del ADN monocatenario retrotranscrito (Stetson et al., 2008). Además, mediante el uso de antiretrovirales se ha visto que la supervivencia de los ratones deficientes en TREX1 aumenta (Beck-Engeser et al., 2011). Por lo tanto, el déficit funcional de las proteínas asociadas con el AGS podría favorecer la acumulación de ácidos nucleicos derivados de retrotransposones debido a la alteración de los mecanismos que los controlan (Figura 17). Sin embargo, en una publicación más reciente donde utilizaron el mismo modelo de ratón deficiente en la exonucleasa TREX1, no consiguieron reproducir la existencia de los retrotransposones (Ahn et al., 2014), tal y como ocurrió en nuestro grupo (datos no publicados).

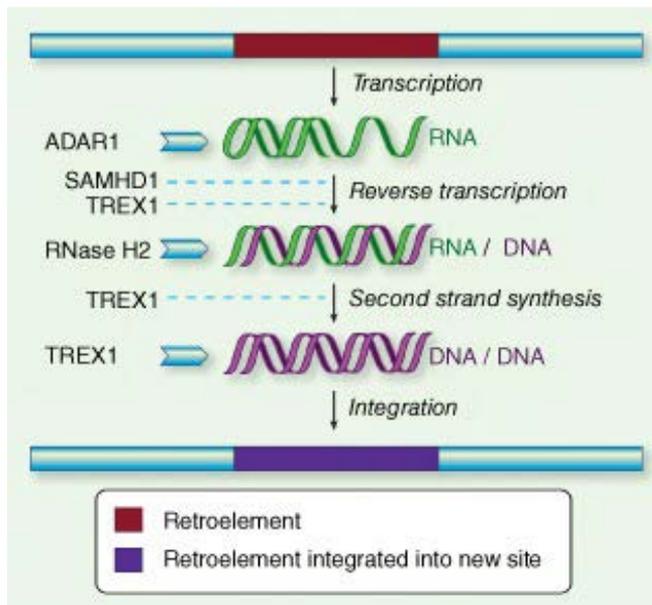


Figura 17. Las proteínas relacionadas con el AGS y el metabolismo de los retrotransposones. TREX1, degradación de los retrotransposones; SAMHD1, degradación de los dNTPs; ADAR1, edición del dsRNA de las secuencias *Alu*; RNasa H2, degradación del ARN y de los híbridos ADN:ARN (Crow et al., 2014).

Las células que inician el AGS

Pese a que el AGS implica una alteración en el sistema inmunitario, aún se desconoce cuáles son las células que inician el desarrollo de la enfermedad. En los últimos años se ha intentado esclarecer esta cuestión usando de nuevo el modelo de ratón deficiente en TREX1 (Morita et al., 2004a).

En el año 2012 se definió a la exonucleasa TREX1 como un regulador negativo de la vía cGAS/STING, la cual induce la respuesta inmunitaria innata mediada por IFNs de tipo I. Además, se monitorizó el origen de la producción del IFN de tipo I *in vivo* en ratones deficientes en TREX1. De esta manera se detectó el origen de la respuesta en el endocardio de los ratones, por lo cual la respuesta restringida a tejido podría dar inicio a la enfermedad. Para testar esta hipótesis realizaron una serie de quimeras de médula ósea en ratones (Gall et al., 2012). Así se demostró que la deficiencia de TREX1 en las células no hematopoyéticas es suficiente para inducir la enfermedad. Además, se determinó que el IFNAR1 en las células hematopoyéticas es necesario para detectar el IFN producido por las células iniciadoras y permitir la expansión y el reclutamiento de los linfocitos autorreactivos (Figura 18A) (Gall et al., 2012).

En 2014, otro grupo de investigación que había participado en la publicación anterior quiso evaluar de nuevo el rol de las células hematopoyéticas en el inicio de la enfermedad. En este caso se demostró que los macrófagos, los neutrófilos y las células dendríticas son los responsables de la inflamación en ratones deficientes en TREX1. Además, mediante experimentos de transferencia adoptiva de médula ósea se demostró que la autoinmunidad puede prevenirse mediante un trasplante de médula ósea (Figura 18B) (Ahn et al., 2014).

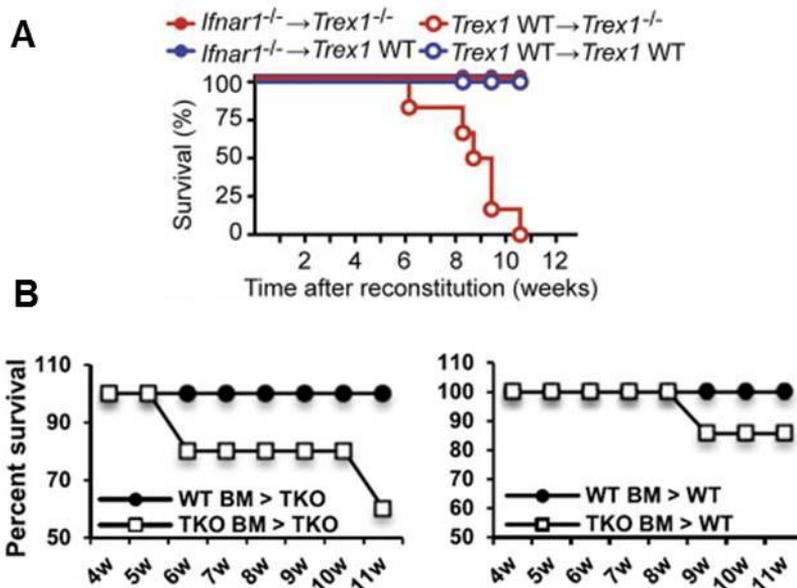


Figura 18. Contradicciones en el origen del AGS. (A) Curvas de supervivencia de ratones *Trex1*^{-/-}*Rag2*^{-/-} o *Rag2*^{-/-} reconstituidos con médula ósea de ratones *Ifnar1*^{-/-} o *Wild Type* (WT). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (n=5 por grupo) (Gall et al., 2012). (B) Curvas de supervivencia de ratones *Trex1*^{-/-} o WT reconstituidos con médula ósea de ratones *Trex1*^{-/-} o WT. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes (al menos n=4 por grupo).

En nuestro grupo en el año 2011 se caracterizó por primera vez la expresión de *Trex1* en los macrófagos primarios estimulados con IFN- γ (Serra et al., 2011). En el año 2013 se demostró que TREX1 es un regulador negativo de la activación proinflamatoria de los macrófagos. En los macrófagos deficientes en TREX1 disminuye la capacidad de fagocitar cuerpos apoptóticos, y aumenta la producción de citocinas proinflamatorias, los niveles de CD68 y la presentación antigénica (Pereira-Lopes et al., 2013). Así pues, este estado de activación podría explicar la inducción o la tendencia a desarrollar autoinmunidad. Por lo cual los macrófagos tienen un papel clave en el desarrollo de las enfermedades asociadas a mutaciones en *TREX1* como el AGS.

Proteína 1 con dominio SAM y HD (SAMHD1)

▪ Estructura y función de *Samhd1*

La proteína SAMHD1, de 626 aminoácidos, contiene en la región N-terminal un motivo estéril alfa (SAM) seguido de un dominio histidina-aspártico (HD). El dominio SAM sirve para interactuar con otras proteínas, ADN o ARN, mientras que el dominio HD contiene regiones reguladoras y confiere la actividad enzimática. Así pues, SAMHD1 presenta actividad fosfohidrolasa y nucleasa asociadas a HD, donde el dominio SAM no es crítico pero si necesario para aumentar ambas actividades enzimáticas (Buzovetsky et al., 2018). Por otro lado, la región C-terminal es importante en la estabilización de la forma oligomérica de la enzima y en la interacción con los ácidos nucleicos.

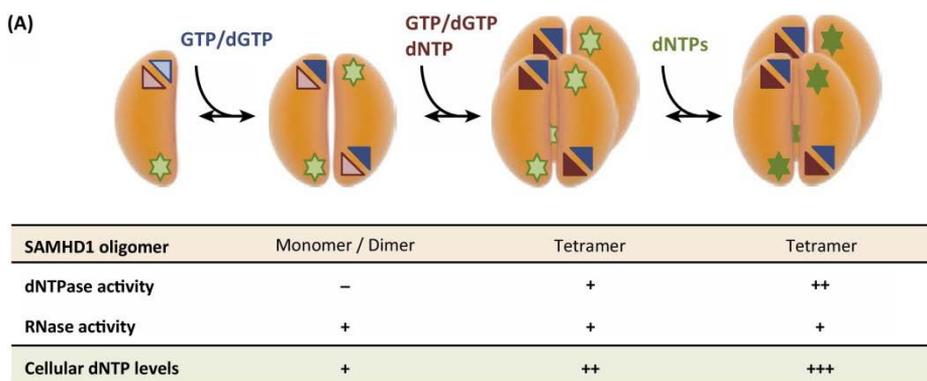


Figura 19: Esquema de la oligomerización de SAMHD1. Cada monómero contiene dos regiones reguladoras (triángulo) y un sitio de unión al sustrato (estrella). La activación de SAMHD1 requiere la unión de GTP o dGTP (triángulos rellenos). También se muestra la actividad dNTPasa y RNasa, y los niveles de dNTPs requeridos en cada forma (Ballana and Esté, 2015).

Normalmente SAMHD1 se encuentra en equilibrio en forma de monómero o dímero. Cada monómero contiene dos lugares de regulación dónde se unen los desoxinucleotidos (dNTPs). De modo que cuando los niveles de trifosfato de desoxiguanosina (dGTP) son bajos, SAMHD1 se encuentra en forma de monómero o dímero, con actividad nucleasa pero no dNTPasa. Sin embargo,

cuando los niveles de dGTP son elevados, se induce el cambio conformacional de SAMHD1 a tetrámero dotándolo de actividad dNTPasa (Figura 19).

En mamíferos SAMHD1 es la responsable de regular negativamente la concentración de dNTPs intracelulares. De manera que mediante su actividad fosfohidrolasa es capaz de degradar los dNTPs a desoxinucleosido (dN) y trifosfato inorgánico (PPP) (Ji et al., 2014). El mantenimiento de unos niveles apropiados de dNTPs intracelulares es crítico en la replicación y en la reparación del ADN durante la división celular, por lo que SAMHD1 participa en el mantenimiento de la integridad genómica de las células (Kretschmer et al., 2015). Por otro lado, SAMHD1 restringe la retrotranscripción vírica al limitar la concentración de dNTPs intracelulares. En células quiescentes, como los macrófagos y las células dendríticas, la concentración de dNTPs intracelulares tiende a ser 10 veces menor gracias a la alta expresión de SAMHD1. De este modo éstas células están protegidas frente a infecciones por retrovirus y herpesvirus (Lahouassa et al., 2012; Schmidt et al., 2015). No obstante, el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo II (VIH-II) y la mayoría de virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS) codifican la proteína vírica X (Vpx), que induce la degradación de SAMHD1 vía proteosoma permitiendo la acumulación de dNTPs (Hollenbaugh et al., 2014a). Además, SAMHD1 tiene actividad exonucleasa en sentido 3'-5' sobre ADN y ARN monocatenario, útiles en su acción antivírica. Por otro lado, durante el ciclo celular los complejos formados por CDK1 o CDK2 (Fase G1-S) fosforilan a SAMHD1, regulando negativamente su actividad RNasa (Pauls et al., 2014; Yan et al., 2015). Por último, se ha relacionado a SAMHD1 con los mecanismos de reparación de las roturas del ADN de doble cadena. Así pues, SAMHD1, a través del reclutamiento de *CtBP-interacting protein* (CtIP), facilita la *DNA end resection* induciendo la recombinación homóloga (HR) (Daddacha et al., 2017).

▪ **Enfermedades asociadas a Samhd1**

SAMHD1 es una proteína cuya actividad enzimática es esencial en el metabolismo de los ácidos nucleicos, así que cualquier cambio en sus funciones puede resultar en alguna patología. Se han identificado distintas mutaciones que

afectan negativamente a la actividad dNTPasa de SAMHD1 (Figura 20) (Mauney and Hollis, 2018).

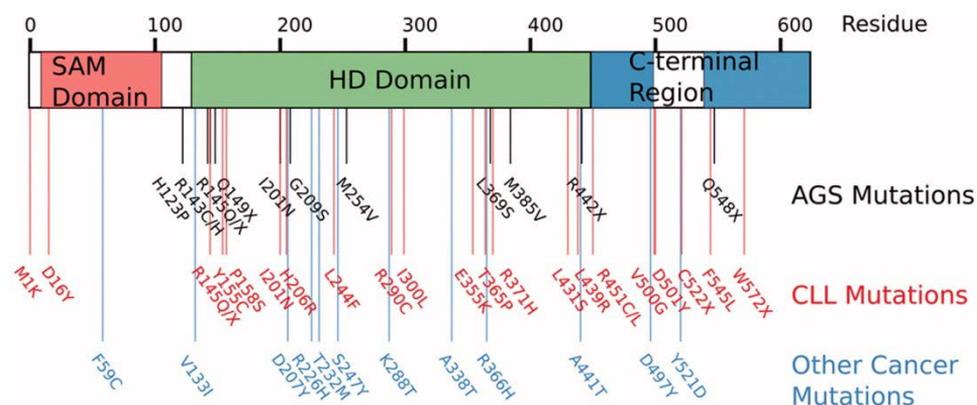


Figura 20. Esquema del gen de SAMHD1 y la localización de las mutaciones en AGS y cáncer. La proteína SAMHD1 consiste en una región N-terminal con un motivo estéril alfa (SAM) y un dominio catalítico histidina-aspártico (HD), y una región C-terminal. Se han identificado mutaciones en pacientes con AGS que resultan en la pérdida de función de SAMHD1, y consecuentemente la desregulación del metabolismo de ácidos nucleicos. También se han descrito mutaciones relacionadas con el cáncer (Mauney and Hollis, 2018).

Por un lado, la pérdida de función de SAMHD1 causa la acumulación de ácidos nucleicos endógenos no procesados en el citosol. Éstos son reconocidos como si fueran patógenos invasores mediante las vías de reconocimiento de ácidos nucleicos, como por ejemplo la vía cGAS/STING, que culmina en la inducción de la respuesta inmunitaria mediada por interferones de tipo I (Maelfait et al., 2016). Es el caso de los pacientes con AGS, de los cuales el 13% tienen alguna mutación en el gen SAMHD1. Éstas suelen resultar en la pérdida total de la actividad enzimática (Crow et al., 2015; Rice et al., 2009).

Por otro lado, durante el ciclo celular si los niveles de dNTPS son elevados se pueden producir errores en la replicación del ADN, la proliferación incontrolada de las células y cáncer. En pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) se ha descrito que un 11% presentan mutaciones en el gen de SAMHD1 (Clifford et al., 2014).

▪ **Modelo en ratón para el AGS: *Samhd1*^{-/-}**

El modelo de ratón *knock-out* de *Samhd1* (*Samhd1*^{-/-}) (Rehwinkel et al., 2013) no desarrolla un fenotipo similar al AGS. Asimismo, no presenta un incremento de interferones de tipo I en el suero, aunque sí se ha detectado la sobreexpresión de genes estimulados por interferón (ISGs) en el bazo y en los macrófagos. Además, los niveles de dNTPs intracelulares son más altos que en el ratón *wild type* (WT). No obstante, el ratón *Samhd1*^{-/-} no es más susceptible a la infección por vectores de HIV-1, por lo que la concentración de dNTPs no es un factor limitante en el modelo de ratón. Sin embargo, el ratón *Samhd1*^{-/-} es más sensible a la infección por el vector HIV-1, cuando está modificado de manera que la retrotranscriptasa (RT) tiene menor afinidad por los dNTPs. Esta sensibilidad también se ha detectado en los cultivos primarios de macrófagos, células dendríticas y fibroblastos de ratones deficientes en *Samhd1*. Por lo tanto, *Samhd1* en ratón también limita la retrotranscripción vírica (Maelfait et al., 2016; Rehwinkel et al., 2013). Este ratón solamente mimetiza de manera parcial con el fenotipo humano de AGS. No obstante, sirve como herramienta para entender la función de *Samhd1* en el contexto de la autoinmunidad y de otras enfermedades inflamatorias (Figura 21) (Roesch and Schwartz, 2013).

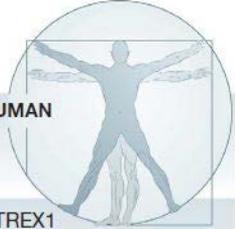
| | HUMAN | MOUSE |
|---|---|--|
| |  |  |
| Genes causing Aicardi Goutières syndrome-like symptoms or autoimmunity | <ul style="list-style-type: none"> • TREX1 • ADAR1 • SAMHD1 • RNASEH2A • RNASEH2B • RNASEH2C | Yes <ul style="list-style-type: none"> • TREX1 • ADAR1 No <ul style="list-style-type: none"> • SAMHD1 • RNASEH2B • RNASEH2C |
| dNTP content in wild-type macrophages | Low 0.05 μ M | High 0.5 μ M |
| SAMHD1 effect on dNTPs | 5-to 30-fold decrease in resting cells | 5-fold decrease in resting cells |
| Viruses restricted by SAMHD1 | Retroviruses <ul style="list-style-type: none"> • HIV • FIV • RSV • MPMV • EIAV DNA viruses <ul style="list-style-type: none"> • Vaccinia virus • Herpes simplex virus 1 | Modified HIV vector |
| Other features of SAMHD1 | <ul style="list-style-type: none"> • Nucleic acid binding and cleavage • Link with some cancers • Negatively regulated by phosphorylation | ND |

Figura 21. SAMHD1 en humanos y ratones. Comparación de los genes causantes de AGS, los niveles de dNTPs intracelulares en los macrófagos y los efectos de SAMHD1 (Roesch and Schwartz, 2013).

El complejo Ribonucleasa H2 (RNasaH2)

▪ Estructura y funciones del complejo RNasa H2

El complejo RNasa H2 está formado por las subunidades RNAsAH2A (301 aminoácidos), RNAsAH2B (308 aminoácidos) y RNAsAH2C (166 aminoácidos). La proteína RNAsAH2C se encuentra entre las otras dos subunidades facilitando la cohesión del complejo. Ésta se une a la región N-terminal de la proteína RNAsAH2B, la cual es capaz de interactuar con otras proteínas mediante su región C-terminal. Además, la proteína RNAsAH2A contiene en su región C-terminal el dominio catalítico y un motivo α/β que le permite anclarse al heterodímero H2BC mediante la formación de un motivo *triple barrel* (triple barril) (Reijns et al., 2011; Shaban et al., 2010). La subunidad RNAsAH2A está dotada de la actividad endoribonucleasa, mientras que las subunidades RNAsAH2B y RNAsAH2C proporcionan estabilidad al complejo y facilitan la interacción con otras proteínas. No obstante, las tres subunidades son necesarias para su actividad enzimática (Figura 22) (Reijns et al., 2011; Shaban et al., 2010).

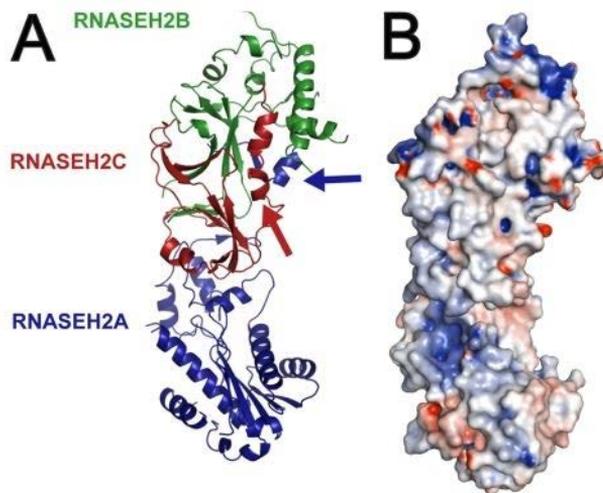


Figura 22: Estructura del complejo RNasa H2. (A) Representación del complejo RNasa H2 humano. Se indica la región C-terminal de la RNAsAH2C (flecha roja) y la región C-terminal de la RNAsAH2A (flecha azul), donde se muestra el primer (asterisco gris) y último residuo (asterisco azul). (B) Superficie electrostática del complejo RNasa H2 humano. Zonas electropositivas (azul) y electronegativas (rojo) (Reijns et al., 2011).

En los mamíferos el complejo RNasa H2 es la mayor fuente de actividad RNasa H por lo que es fundamental en el mantenimiento de la integridad genómica. Su actividad ribonucleasa le permite degradar el ARN en los híbridos ARN:ADN (Jackson and Bartek, 2009). Asimismo, durante la replicación del ADN, es capaz de eliminar los cebadores de ARN en la cadena discontinua formada por los fragmentos de Okazaki (Chon et al., 2013). Además forma parte del mecanismo de vigilancia durante la replicación del ADN, ya sea localizando y escindiendo ribonucleótidos para facilitar la intervención de enzimas reparadoras, o bien eliminando directamente los *R-loops* que se generan durante la transcripción (Chon et al., 2009, 2013; Hiller et al., 2012; Pizzi et al., 2015).

▪ **Enfermedades asociadas a RNasaH2**

El complejo RNasa H2 tiene un papel fundamental en el metabolismo de los ácidos nucleicos, por lo que una alteración en sus funciones puede causar diversas patologías. Se han identificado distintas mutaciones que reducen drásticamente su actividad ribonucleasa, causando la acumulación de híbridos ARN:ADN endógenos en el citosol (Reijns et al., 2011). Éstos son reconocidos a través de las vías de señalización de ácidos nucleicos cGAS/STING, que culminan en la inducción de la respuesta inmunitaria mediada por IFNs de tipo I (Mackenzie et al., 2016; Pokatayev et al., 2016). Es el caso de los pacientes con AGS, de los cuales el 53% tienen alguna mutación en el gen que codifica para alguna de las tres subunidades que forman el complejo (Figura 23) (Crow et al., 2006a, 2015).

Las mutaciones identificadas disminuyen parcialmente la actividad ribonucleasa del complejo RNasa H2. Esta reducción se produce mediante la inactivación del dominio catalítico, la alteración en la interacción con proteínas o ácidos nucleicos, o la desestabilización de la formación del complejo (Chon et al., 2009; Coffin et al., 2011). De hecho, todos los mutantes de la RNasa H2 mantienen su actividad catalítica, por lo que la pérdida total de su función es letal (Perrino et al., 2009).

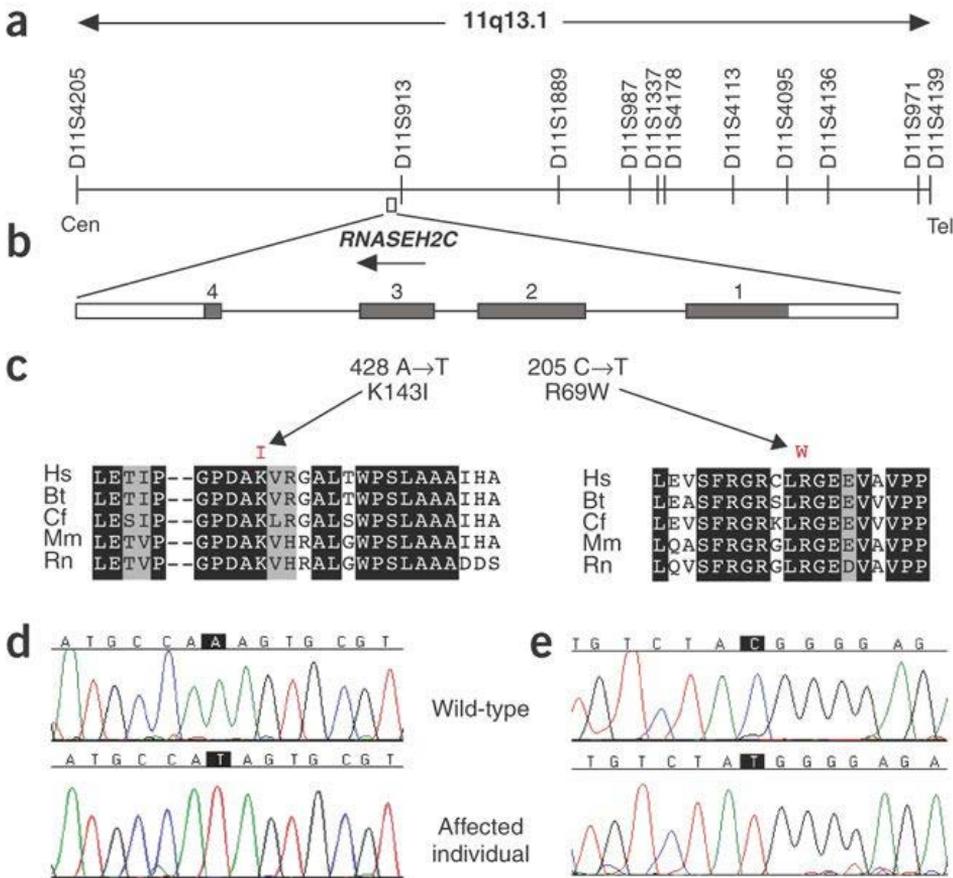


Figura 23. Mutaciones en el gen de la RNASA H2C que causan AGS. (A) Mapa genético del cromosoma 11q13.1. (B) Estructura del gen RNASA H2C y sus mutaciones. (C) Las dos mutaciones afectan residuos conservados en mamíferos. Hs, *Homo sapiens*; Bt, *Bos Taurus*; Cf, *Canis familiaris*; Mm, *Mus msuculus*; Rn, *Rattus norvegicus*. Los aminoácidos sustituidos se muestran en rojo. (D, E) Secuencia electroferograma de las mutaciones de *Rnasa h2c* 428A→T (d) y 205C→T (e) (Crow et al., 2006a).

▪ **Modelo en ratón para el AGS: RNasa H2^{R69W/R69W}**

La secuencia de los genes que codifican para las tres subunidades del complejo RNasa H2 es muy similar entre humanos y el modelo en ratón. Por ende, la estructura del complejo RNasa H2 también es muy parecida (Reijns et al., 2011). Así pues, se han generado distintos modelos de ratón para el estudio de las

mutaciones detectadas en pacientes con AGS (Rabe, 2013). Algunos ejemplos son el modelo de ratón *knock-in Rnasa h2a* con la mutación G37S (*RNasah2a^{G37S}*) no viable (Pokatayev et al., 2016), el *knock-in Rnasa h2b* con la mutación A174T (*RNasah2b^{A174T}*) viable (Mackenzie et al., 2016) o el ratón *knock-out* de *Rnasa h2c* (*Rnasa h2c^{-/-}*) no viable (Hiller et al., 2012).

El ratón *knock-in Rnasa h2c* con la mutación R69W (*Rnasa h2c^{R69W/R69W}*) (Datos no publicados) es viable pese a tener la actividad enzimática del complejo reducida al 35% (Chon et al., 2009). Estos ratones *knock-in* mimetizan la alteración del aminoácido R69W (cambio de C a T) que padecen algunos pacientes con AGS (Crow et al., 2006b). Esta mutación hace que el complejo RNasa H2 pierda estabilidad y consecuentemente disminuya su actividad RNasa H. No obstante, este modelo sirve como herramienta para entender la función de RNasa H2 en el contexto de la autoinmunidad y de otras enfermedades inflamatorias.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Durante la activación proinflamatoria los macrófagos producen grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno que pueden dañar el ADN. La proteína Samhd1 y el complejo RNasa H2 protegen a los macrófagos de dicho daño.

Objetivos

- Evaluar la función de Samhd1 y RNasa H2 en los macrófagos activados con estímulos proinflamatorios.
- Estudiar el papel de Samhd1 y RNasa H2 en modelos de enfermedades autoinmunitarias y de inflamación.

Materiales y métodos

Ratones

Se utilizaron ratones de 6-11 semanas hembras C57BL/6JRj de la casa comercial Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, Francia).

Los ratones *Samhd1*^{-/-} (Rehwinkel et al., 2013) y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (Datos no publicados), fueron cedidos amablemente por el Profesor David Bonthron (Leeds Institute of Molecular Medicine, Universidad de Leeds). Ambas colonias fueron generadas en un *background* C57BL/6JRj.

Los ratones fueron mantenidos en condiciones *specific pathogen free* (SPF) en el estabulario del Parque Científico de Barcelona (PCB-PRBB) o en el estabulario de la Universidad de Barcelona de la facultad de Psicología o Biología. (CCiTUB).

Los procedimientos de experimentación animal fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEAA) de la Generalitat de Catalunya, número 9158.

Cultivos celulares

Los macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) se obtuvieron a partir de ratones de 6-11 semanas como se ha descrito anteriormente (Celada et al., 1984). Las células de la médula ósea se obtuvieron de los fémures y de las tibias. Se cultivaron en 4 placas de cultivo de plástico (150 mm) por ratón, en medio DMEM (Lonza, Basel) con un 20% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y un 30% de medio condicionado de células L929 (fuente de M-CSF). Además, el medio de cultivo se suplementó con penicilina (100U/ml) y estreptomycin (100µg/ml) (Sigma Aldrich, Sant Louis, MO). Las células se incubaron a 37°C en una atmosfera húmeda con un 5%CO₂. Después de 7 días de cultivo, se obtiene una población homogénea (>99% F4/80⁺ CD11b⁺) de macrófagos adherentes a razón de unos 120x10⁶ de células por ratón. Antes de someter a los macrófagos a distintos estímulos, se cultivaron en medio sin factores de crecimiento durante 16-18 horas para sincronizarlos en el ciclo celular.

Reactivos

Las citocinas y los factores de crecimiento utilizados son proteínas recombinantes de origen murino. El IFN- γ y la IL-4 fueron adquiridos de R&D Systems (Minneapolis, MN), el GM-CSF de Preprotech (Rocky Hill, New Jersey) y el LPS (*E. coli* serotipo O127:B8, L3129) de Sigma Aldrich (Sant Louis, MO). Se utilizaron en concentraciones saturantes (10ng/ml).

Todos los reactivos químicos utilizados fueron obtenidos en su máximo grado de pureza a través del proveedor Sigma Aldrich (Sant Louis, MO), a no ser que se especifique otro proveedor.

Genotipación

▪ Obtención del ADN genómico

Se utilizaron los trozos de orejas obtenidos en los marcajes de los ratones. Se colocaron en un tubo *Eppendorf* y se añadieron 17 μ l del tampón de digestión (50mM Tris pH=8, 20mM NaCl, 1mM EDTA pH=8, 1%SDS) y 3 μ l de proteinasa K (20mg/ml) (Roche, Basel, Basel-Town). Se incubaron en un baño a 55°C durante 2 horas. Se realizó un *vortex* de 10 segundos y se añadieron 500 μ l de agua milli-Q. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos, se centrifugaron brevemente y se conservaron a 4°C hasta que se realizó la PCR.

▪ Genotipación de los ratones *Samhd1*^{-/-}

Tal y como indica el fabricante se utilizó la *GoTag G2 Hot Start Green Master Mix* (Promega, Madison, WI) con los cebadores (20 μ M) (Sigma Aldrich) indicados en la Tabla 1. Se realizó la reacción de PCR siguiendo las siguientes indicaciones: 94°C 5'; 35 ciclos de 94°C 30", 64°C 30" y 72°C 1'; 72°C 10'. Se cargaron 15 μ l de muestra en un gel de agarosa al 1% (Sigma Aldrich). Tras correr el gel, se identificó el alelo WT (535pb), KO (346pb) y flanqueado (636pb).

| Cebador | Secuencia |
|-------------|------------------------------|
| A1494 (B0) | TTTGGTTCTAGGCACTCTTCTG |
| A485 (C0) | TTCCTTATGGATGGTTGTAAGCC |
| PJR259 (D0) | ACGAAGTTATATTATGTACCTGACTGAT |

Tabla 1. Cebadores utilizados en la genotipación de los ratones *Samhd1*^{-/-}.

▪ **Genotipación de los ratones *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}**

Tal y como indica el fabricante se utilizó la *GoTag G2 Hot Start Green Master Mix* (Promega, Madison, WI) con los cebadores (10µM) (Sigma Aldrich) indicados en la Tabla 2. Se realizó la reacción de PCR siguiendo las siguientes indicaciones: 94°C 2'; 30 ciclos de 94°C 30'', 58°C 30'' y 72°C 30''; 72°C 3'. Se cargaron 15µl de muestra en un gel de agarosa al 1% (Sigma Aldrich). Tras correr el gel, se identificó el alelo WT (400pb) y KI (500pb).

| Cebador | Secuencia |
|---------|-----------------------|
| BspE-F | GCAGCAGCGGTACGTATACTC |
| BspE-R | CTAAGGTGCCACAGACTCAG |

Tabla 2. Cebadores utilizados en la genotipación de los ratones *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}.

Análisis de la expresión génica

▪ **Extracción y purificación del ARN**

La extracción del RNA total, purificación y el tratamiento con ADNasa de los macrófagos se realizó siguiendo el protocolo para células adherentes del kit *ReliaPrepTM RNA Cell Miniprep System* (Promega).

En el caso de los tejidos se incubaron las muestras con *TRizol® Reagent* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se realizó la purificación y el tratamiento con ADNasa siguiendo el protocolo para tejidos del kit *PureLinkTM RNA Mini Kit* (Ambion, Thermo Fisher Scientific).

▪ PCR reversa

Para la síntesis de ADNc a partir de muestras de macrófagos se utilizaron 500ng de ARN total cuantificados previamente con un espectrofotómetro Nanodrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific). En el caso de los tejidos se utilizó 1µg de ARN total. En la retrotranscripción se utilizó la transcriptasa reversa *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV) RNasa H Minus Point Mutant (Promega) tal y como describe el fabricante.

▪ PCR en tiempo real

Para la PCR en tiempo real se utilizó *SYBR Green PCR Master Mix 1X* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) tal y como indica el fabricante con la excepción de que el volumen final de la *SYBR Green PCR Master Mix* fue de 10µl. Como controles negativos se utilizaron muestras de ARN sin retrotranscribir en cada gen. Cuando se detectó señal en los controles negativos (<32Ct), el par de cebadores utilizado fue descartado y remplazado por otros cebadores alternativos para el mismo gen. Además, se calculó la eficiencia de la amplificación para cada par de cebadores mediante el uso de una curva estándar generada a partir de diluciones seriadas de muestras de ADNc. Solamente se utilizaron cebadores con una eficiencia del 100±10%.

La monitorización de la PCR se realizó por triplicado mediante el sistema de PCR ABI Prism 7900 (Applied Biosystems) y el software de análisis SDS (Applied Biosystems). Los datos se analizaron con el método *Relative Standard Curve* (Larionov et al., 2005) y se mostraron como los niveles relativos de ARNm del gen de interés normalizados respecto a los genes controles de expresión constitutiva *L14*, *Hprt1* y *Sdha* para cada muestra. Se utilizaron los cebadores descritos en la Tabla 3.

| Gen | Cebador directo | Cebador reverso |
|--------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <i>Arg-1</i> | TTGCGAGACGTAGACCCTGG | CAAAGCTCAGGTGAATCGGC |
| <i>Catalasa</i> | TTTTGCCTACCCGGACTC | GGGTAATAGTTGGGGGCAC |
| <i>Ccl5</i> | ACGTCAAGGAGTATTCTACAC | GATGTATTCTTGAACCCACT |
| <i>Cxcl10</i> | ATGACGGGCCAGTGAGAATG | ATTCCGGATTGAGACATCTCT |
| <i>Fizz-1</i> | TCTGCCCCAGGATGCCAACTTTGA | GTCCAGTCAACGAGTAAGCACAGGC |
| <i>Hprt1</i> | ATCATTATGCCGAGGATTTGG | GCAAAGAACTTATAGCCCCC |
| <i>Ifi44</i> | CTGATTACAAAAGAAGACATGACAGA | AGGCAAAACCAAAGACTCCA |
| <i>Ifit1</i> | TCTAAACAGGGCCTTGACAG | GCAGAGCCCTTTTTGATAATGT |
| <i>Ifit3</i> | TGAACTGCTCAGCCCACA | TCCCGTTGACCTCACTC |
| <i>Il-1β</i> | TGGGCCTCAAAGGAAAGAAT | CAGGCTTGCTCTGCTTGT |
| <i>Il-6</i> | CCAGAGATACAAAGAAATGATGG | ACTCCAGAAGACCAGAGGAAAT |
| <i>L14</i> | TCCCAGGCTGTTAACGCGGT | GCGCTGGCTGAATGCTCTG |
| <i>Nos-2</i> | GCCACCAACAATGGCAACA | CGTACCGGATGAGCTGTGAATT |
| <i>Oas1a</i> | GCTGCCAGCCTTTGATGT | TGGCATAGATTCTGGGATCA |
| <i>p21</i> | TGAGGAGGAGCATGAATGGAG | GAACAGGTCGGACATCACC |
| <i>Rnasah2a</i> | CGAGACAAGGCTGTGAAGAAC | TGTGCTCCAACGAACCGTA |
| <i>Rnasah2b</i> | TCTCTGGTGGTCAGGTTTCC | TTTCTTTGATGGAGGGTTGG |
| <i>Rnasah2c</i> | AGATGCCAAAGTGCATAGGG | CCACAGACTCAGGCATTGTG |
| <i>Samhd1</i> | CAGCTCATTCCGGGTGTACTGT | GTGGCTTGGTGAAGTCCCT |
| <i>Sdha</i> | TGGGGAGTGCCGTGGTGCA | CATGGCTGTGCCGTCCCCTG |
| <i>Sod1</i> | GGAACCATCCACTTCGAGCA | CCCATGCTGGCCTTCAGTTA |
| <i>Sod2</i> | AGGAGAAGTACCACGAGGCT | GCAGGCAGCAATCTGTAAGC |
| <i>Tgf-β</i> | GAGACGGAATACAGGGCTTTC | TCTCTGTGGAGCTGAAGCAAT |
| <i>Tnf-α</i> | CCAGACCCCTCACACTCAGATC | CACTTGGTGGTTTGCTACGAC |

Tabla 3. Cebadores utilizados en las PCR en tiempo real.

Análisis proteico

▪ Extracción de proteína

Se lavaron los macrófagos con tampón fosfato salino (PBS) frío. Para la lisis se utilizó el tampón de lisis TGH 250mM (50mM HEPES pH=7,5, 250mM NaCl, 1% Tritón, 10% glicerol y agua mQ) suplementado con un coctel de inhibidores (1 μ g/ml aprotinina y leupeptina, 0.86mg/ml iodacetamida, 1mM ortovanadato, 0.2mg/ml PMSF y 1mM DTT) (Sigma Aldrich). Se incubó durante 30 minutos en el agitador orbital a 4°C. A continuación, se centrifugaron las muestras a

12000rcf y se guardó el sobrenadante donde se encuentran las proteínas. Después se realizó la cuantificación de las proteínas mediante el método Bradford con el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, Hercules, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el análisis se utilizó el espectrofotómetro Elx800 (BioTek, Winooski, Vermont) con el *software* KC Junior (BioTek).

▪ **Electroforesis y transferencia**

Para la electroforesis se cargaron 50µg de proteína de cada muestra y se utilizó el marcador de peso molecular *ECL Rainbow*. (Amersham, GE Healthcare, Chicago). Previamente se añadió *Laemmli Sample Buffer* con β-mercaptoetanol, y se incubaron a 95°C durante 5 minutos. Se realizó la electroforesis de las muestras de interés en geles SDS-PAGE con un porcentaje de acrilamida del 10%. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF *iBlot2 Regular Transfer Stacks* (Thermo Fisher Scientific), mediante el sistema de transferencia *iBlot2 Dry Blotting* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

▪ **Western Blot de Samhd1**

Las membranas fueron bloqueadas para evitar uniones inespecíficas durante 1 hora a temperatura ambiente (5% de leche desnatada en *Tris buffer saline-Tween* (TBS-T) 0,1%). Después se incubaron con el anticuerpo primario anti-Samhd1 (Ratón, monoclonal) diluido a 1:500 (v/v) (Abcam, Cambridge) en solución bloqueante (TBS-T 0,1% y 5% de albúmina sérica bovina, BSA) durante una noche (O/N) a 4°C. Tras 3 lavados de 5 minutos con TBS-T 0,1%, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (dilución 1:2000), conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP), en solución bloqueante (TBS-T 0,1% y 5% leche) durante una hora a temperatura ambiente. Por último, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-T 0,1%. Se utilizó como control de carga la β-actina, que se determinó mediante el anticuerpo anti-β-actina (Ratón, monoclonal) diluido a 1:10000 (v/v) (Sigma Aldrich).

Para el revelado se utilizó el kit de revelado ECL (Amersham) con sustratos quimioluminiscentes sobre la membrana y películas de detección de quimioluminiscencia (Fujifilm, Valhalla, New York). Las bandas se cuantificaron

por densitometría con el software de análisis *ImageJ* (Fiji, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Citometría de flujo

▪ Tinción de marcadores extracelulares

Los macrófagos se resuspendieron en PBS y se distribuyeron en placas de 96 pocillos con fondo en V (BD, Franklin Lakes, New Jersey) a razón de 1×10^6 células/pocillo. Se centrifugaron a 3000rcf 3 minutos a 4°C. Cuando fue necesario se utilizó una solución para fijar las células (PBS con un 4% de paraformaldehído) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 3000rcf 3 minutos a 4°C. Para evitar las uniones no específicas de los anticuerpos a los receptores FcγR, se incubaron los macrófagos durante 15 minutos a 4°C con anticuerpos anti-CD16/CD32 (Rata, monoclonal) (dilución 1:50) (Tonbo Biosciences, San Diego, CA). Para la tinción de los diferentes marcadores celulares, se añadió una mezcla de los anticuerpos correspondientes durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Los anticuerpos conjugados con fluorocromos utilizados (Rata, monoclonal) se muestran en la Tabla 4. Se utilizaron los controles de isotipo correspondientes.

| Antígeno | Fluorocromo | Dilución | Casa comercial |
|----------|-------------|----------|---------------------------|
| F4/80 | APC | 1:100 | Biolegend (San Diego, CA) |
| CD11b | PE | 1:100 | BD Pharmigen |
| Ly6C | FITC | 1:50 | Biolegend |

Tabla 4. Anticuerpos fluorescentes utilizados en el análisis por citometría de flujo.

▪ Ciclo celular

Los macrófagos se lavaron con PBS y a continuación se fijaron con etanol al 95% O/N a 4°C. Los macrófagos fueron teñidos con el reactivo *FxCycle PI/RNase Staining Solution* (Thermo Fisher Scientific) tal y como indica el fabricante. El contenido en DNA de las células se analizó a través del marcaje con yorudo de propidio (IP) mediante el canal FL3 del citómetro. Se analizó el

ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) mediante el software de análisis *MultiCycle 4 AV for Windows* (Phoenix flow systems, San Diego, California).

▪ **Análisis de las ROS**

Para medir las ROS totales los macrófagos se incubaron con 50 μ M de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA) (Sigma Aldrich) en medio de cultivo durante 20 minutos a 37°C en oscuridad. Se realizaron dos lavados con PBS frío. Se recogieron las muestras en PBS con un 5% de FBS y se añadió DAPI. Mediante el canal FL1 del citómetro se analizaron las ROS. En algunos experimentos se utilizó 10mM N-acetil cisteína (NAC) (Sigma Aldrich) 20 minutos antes de tratar las células.

▪ **Estrategia general para el análisis de las muestras**

Después de la tinción las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, Brea, CA). Se seleccionó la población de macrófagos según la dispersión de la luz lateral (complejidad) (SS-Área (A)) y la frontal (tamaño) (FS-A). A continuación, se descartaron los agregados celulares mediante los parámetros FS-A y FS-Width (W). Cuando fue posible, se seleccionaron las células vivas mediante la tinción con DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) (Figura 24). Los datos obtenidos del citómetro fueron analizados con el software de análisis *FlowJo versión 7.6* (Ashland, Oregon).

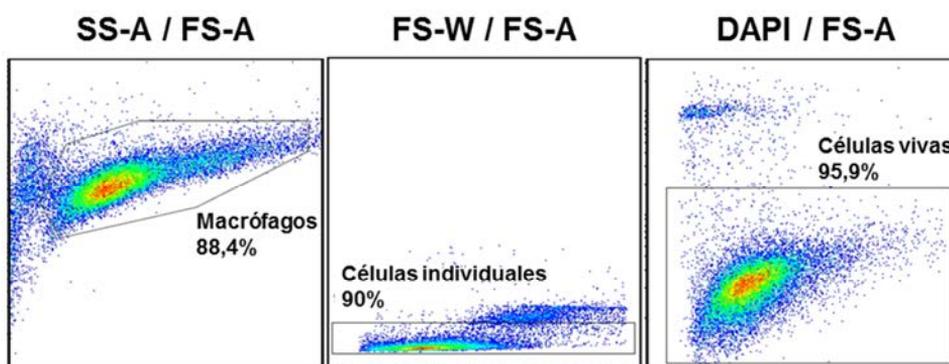


Figura 24. Estrategia para el análisis mediante citometría de flujo. El FS-A está representado en el eje X, mientras que el SS-A, el FS-W y el DAPI están representados en el eje Y.

Proliferación celular

El kit *Cell Proliferation ELISA BrDU* (Roche) se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Los macrófagos fueron cultivados en placas de 96 pocillos a razón de 25000 células/pocillo. Las células se incubaron a 37°C en una atmosfera húmeda con un 5%CO₂. Se utilizó el espectrofotómetro Elx800 (BioTek) con el *software* KC Junior (BioTek).

Microscopia de fluorescencia

▪ **Histona γ -H2AX**

Los macrófagos fueron cultivados sobre lentes (12mm) en placas de 24 pocillos (Falcon, Thermo Fisher Scientific) a razón de 500000 células/pocillo. Se cultivaron en medio sin factores de crecimiento. Tras 16-18 horas las células se trataron con los estímulos indicados. Posteriormente se lavaron las células con PBS y se incubaron en solución fijadora (3,7% de formaldehído en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se incubaron en tampón de permeabilización (0,2% Triton X-100 en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron en tampón bloqueante (2%FBS y 1:250 anti-CD16/CD32 en PBS) a temperatura ambiente. Después de 20 minutos se incubaron con el anticuerpo primario anti-*phospho*-H2AX (Ratón, monoclonal) (Millipore) dilución 1:400 (v/v) en tampón de anticuerpo (2%FBS, 0,25% Tween-20 y 1:250 anti-CD16/CD32 en PBS) O/N a 4°C. Se lavaron las muestras con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG-AF488 o AF568 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) dilución 1:500 (v/v) en tampón de anticuerpo 45 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Las muestras se lavaron con PBS y se tiñeron los núcleos con DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Las muestras se lavaron con PBS y se realizó otro lavado con agua destilada. Para el montaje de las muestras se utilizaron portaobjetos (StarFrost, Knittel, Bielefeld, Alemania) y el medio de montaje *Prolong Gold* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) tal y como indica el fabricante.

Las muestras se analizaron mediante el microscopio confocal SP2 (Leica, Wetzlar) y el software de análisis *Image J* (Fiji, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Modelo animal: EAE

Los experimentos se realizaron en el estabulario de la Universidad de Barcelona de la Facultad de Biología. El procedimiento de experimentación animal EAE fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEAA) de la Generalitat de Catalunya, número 9369 (Mansilla et al., 2015).

▪ **Inducción de la EAE**

Se utilizaron ratones hembras de 8-9 semanas. Los animales fueron anestesiados con una solución de Ketamina (42,5mg/kg) (Imalgene, Merial, Lyon) y Xilacina (6,5mg/kg) (Rompun, Bayer, Leverkusen). Los ratones fueron inmunizados con 100µg de la glucoproteína oligodendrocítica mielínica 40-55 (MOG₄₀₋₅₅, YRSPFSRVVHLYRNGK) (cedido amablemente por el Dr. Gerardo Acosta, Universitat de Barcelona, España), emulsionado en adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich) con 4mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37RA, Difco, Detroit, MI), para generar la respuesta autoinmune contra la lipoproteína neural. Para ello se realizaron 4 inyecciones subcutáneas en las axilas y en las ingles (50µl/lugar). Además, se administró 400ng de la toxina *Bordetella Pertussis* (Sigma Aldrich) por la vía intraperitoneal los días 0 y 2 para incrementar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

▪ **Monitorización de la EAE**

El control y seguimiento de los animales se realizó desde el día de la inducción del modelo EAE hasta el momento del sacrificio de los animales. Se evaluó el peso del animal, las manifestaciones clínicas y los efectos adversos mediante un sistema de puntuaciones. Se realizó en doble ciego por dos observadores distintos.

Score clínico

0, Asintomático; 0'5, Paresia cola; 1, Parálisis cola; 1'5, Paraparesia o debilidad de las patas traseras; 2, Paraparesia severa; 2'5, Paraplejia o parálisis de las extremidades posteriores; 3, Tetraparesia o debilidad de las patas delanteras; 4, Tetraparesia severa; 5, Tetraplejia/moribundo; 6, Muerte por sacrificio o de manera espontánea.

Score de efectos adversos

Automutilaciones o vocalizaciones extrañas (0: No, 3: Sí), aspecto (0: Normal, 1: Pelaje en mal estado, 2: Pelaje en mal estado y presencia de secreciones oculares y nasales, 3: Postura anormal), conducta agresiva o comatoso (0: No, 3: Sí) y peso del animal (0: Normal, 1: Pérdida inferior al 10%, 2: Pérdida entre 10 y 20%, 3: Pérdida de peso superior al 20%).

▪ Medidas correctoras y criterio de punto final

Debido a la pérdida de movilidad de los ratones se utilizaron tetinas más largas en los biberones para facilitarles el acceso al agua. También se les facilitó pienso en el suelo de la jaula. Cuando los ratones alcanzaron un score clínico de 3 se les administró 1 ml/día suero glucosado (10%) por la vía subcutánea. Los animales fueron sacrificados cuando el score clínico era igual o superior a 4, el score de efectos adversos era superior a 8, el animal estaba comatoso o con automutilaciones, o había sufrido una pérdida de peso superior al 20%.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se realizó el test no paramétrico Wilcoxon o Mann-Whitney U cuando la $n \geq 4$ y la prueba T de Student cuando la $n = 3$. En las comparaciones de dos o más variables, se utilizó el test ANOVA de dos factores seguido del test de comparación múltiple de Bonferroni. En las curvas de supervivencia se utilizó el test Mantel-Cox (log-rank) y el test Gehan-Breslow-Wilcoxon. El tratamiento de los datos se realizó mediante el software de análisis estadístico GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, California).

Resultados

Samhd1 y RNasa H2 en los macrófagos

Los estímulos proinflamatorios en los macrófagos inducen a *Samhd1*, mientras que la expresión del complejo RNasaH2 no se modifica

Samhd1 es la fosfohidrolasa encargada de regular negativamente la concentración de dNTPs intracelulares (Ji et al., 2014), mientras que el complejo RNasa H2 es la mayor fuente de actividad RNasa H en los mamíferos (Cerritelli and Crouch, 2009). Dada sus funciones, estas proteínas se expresan ubicuamente, aunque en humanos SAMHD1 se expresa de manera distinta entre los distintos tejidos y los tipos celulares (Schmidt et al., 2015). Con el fin de estudiar la importancia de *Samhd1* y RNasa H2 en el sistema inmunitario, se evaluó la expresión de ARN mensajero (ARNm) en distintos tejidos de ratón mediante PCR en tiempo real.

La expresión de *Samhd1* se detectó en todos los tejidos analizados. No obstante, se observó un aumento significativo de su expresión en tejidos con gran infiltración de células inmunitarias, como son el bazo y la cavidad peritoneal (Figura 25).

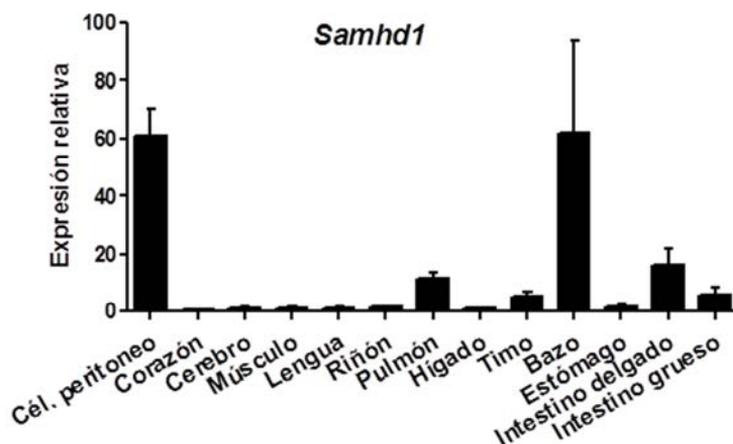


Figura 25. Distribución tejido-específica de *Samhd1*. Se obtuvo el ARNm en los tejidos de ratón indicados y se midió la expresión de *Samhd1* mediante PCR en tiempo real. Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Respecto a la RNasa H2 se detectó la expresión de los tres genes de las subunidades que componen el complejo *Rnasah2a*, *Rnasah2b* y *Rnasah2c* en todos los tejidos estudiados. Además, se observaron niveles elevados de ARNm en el bazo y en la cavidad peritoneal, como se observó en el análisis de la expresión de *Samhd1*. Por último, también se detectó un aumento significativo en la expresión de las tres subunidades que forman el complejo RNasa H2 en el timo (Figura 26).

En conjunto estos resultados indican que la mayor expresión de los genes *Samhd1*, *Rnasah2a*, *Rnasah2b* y *Rnasah2c* se produce en lugares anatómicos con alta actividad del sistema inmunitario, específicamente en los tejidos con gran infiltración de macrófagos. Por lo que estas proteínas podrían tener un papel importante en la biología de estas células.

En primer lugar, intentamos determinar si la expresión de *Samhd1*, *Rnasah2a*, *Rnasah2b* y *Rnasah2c* podría estar relacionada con la actividad de los macrófagos. Para ello estudiamos su expresión en estas células tratadas con diferentes estímulos. A partir de la médula ósea de ratón se obtuvieron macrófagos *in vitro* tal y como se indica en el apartado “Materiales y métodos”. Posteriormente, se incubaron estos macrófagos derivados de médula ósea con concentraciones saturantes de estímulos proinflamatorios (IFN- γ y LPS), antiinflamatorios (IL-4) o proliferativos (M-CSF y GM-CSF). Tras los distintos tratamientos se extrajo el ARN de los macrófagos, y mediante PCR en tiempo real se determinaron los niveles de ARNm.

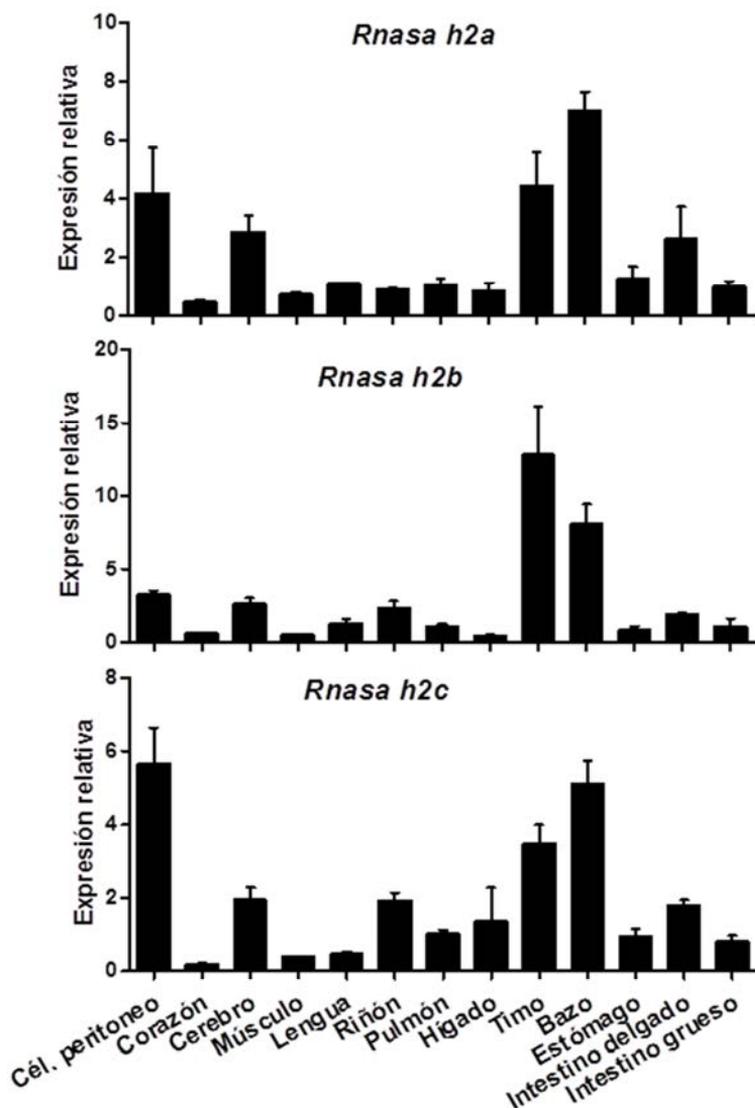


Figura 26. Distribución tejido-específica de *Rnasa h2a*, *Rnasa h2b* y *Rnasa h2c*. Se obtuvo el ARNm en los tejidos de ratón indicados y se midió la expresión de *Rnasa h2a*, *Rnasa h2b* y *Rnasa h2c* mediante PCR en tiempo real. Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

En los macrófagos activados con estímulos proinflamatorios IFN- γ o LPS, se detectaron niveles elevados de ARNm de *Samhd1* con un máximo a las 6 horas de incubación. El tratamiento de los macrófagos con el estímulo antiinflamatorio IL-4 o con estímulos proliferativos M-CSF o GM-CSF no modificó la expresión de

Samhd1 (Figura 27A). Para comprobar que el aumento de ARNm se correlacionaba con la traducción de la proteína *Samhd1* se realizó una determinación de ésta utilizando la técnica de *Western blot*. Para ello se utilizaron macrófagos derivados de médula ósea y se incubaron durante 24 horas con los estímulos señalados anteriormente. Se obtuvieron muestras de proteína y se realizó la técnica *Western blot* seguida de la detección de la proteína *Samhd1* con anticuerpos específicos. En los macrófagos activados con los estímulos proinflamatorios IFN- γ y LPS se detectó un incremento en la producción de la proteína *Samhd1*, aunque era mucho mayor en los macrófagos estimulados con IFN- γ (Figura 27B). Por lo tanto, esta proteína podría ejercer funciones críticas durante la respuesta inflamatoria de los macrófagos.

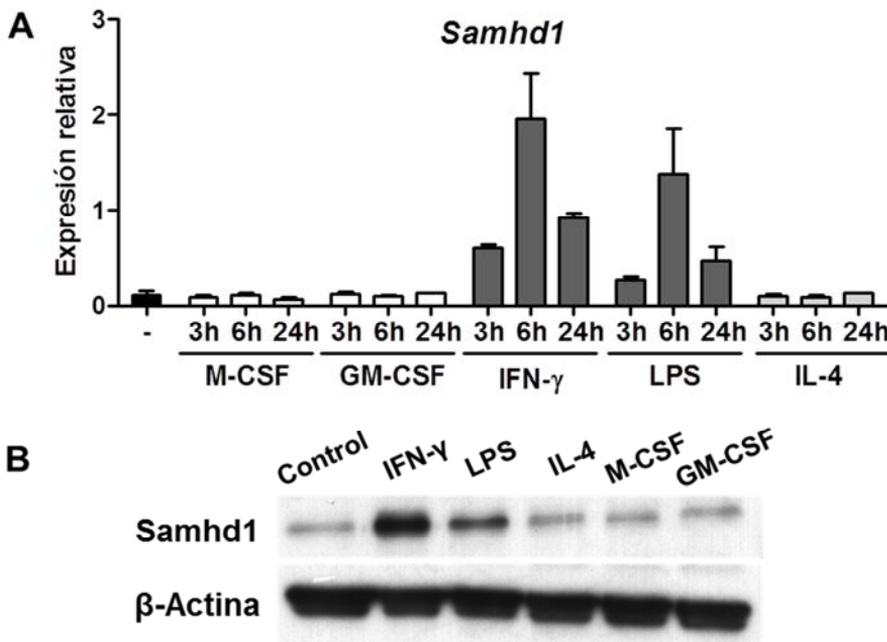


Figura 27. *Samhd1* se induce en los macrófagos por estímulos proinflamatorios.

Los macrófagos derivados de médula ósea se cultivaron en presencia de los estímulos y en los tiempos indicados. (A). Se obtuvo el ARNm y se midió la expresión mediante PCR en tiempo real. Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. (B) Se obtuvo la proteína tras 24 horas de estímulo y se analizaron los niveles mediante *Western blot*. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

No existen mutaciones que impliquen la pérdida total de la actividad enzimática del complejo RNasa H2, debido a que su ausencia total es letal. Además, como se mencionó anteriormente, su expresión es específica en tejidos con gran infiltración de células inmunitarias (Figura 26). Se trataron los macrófagos con los estímulos mencionados anteriormente y se determinó la expresión de las 3 subunidades que forman el complejo RNasa H2.

Los niveles de los genes *Rnasah2a*, *Rnasah2b* y *Rnasah2c* se mostraron constantes en todas las condiciones estudiadas (Figura 28). Sin embargo, esto no descarta que la actividad enzimática del complejo RNasa H2 pudiera ser crítica en la biología macrófago.

En resumen, estos datos sugieren que las actividades enzimáticas de la proteína Samhd1 y del complejo RNasa H2 podrían estar relacionadas en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunitario, donde el macrófago juega un papel protagonista.

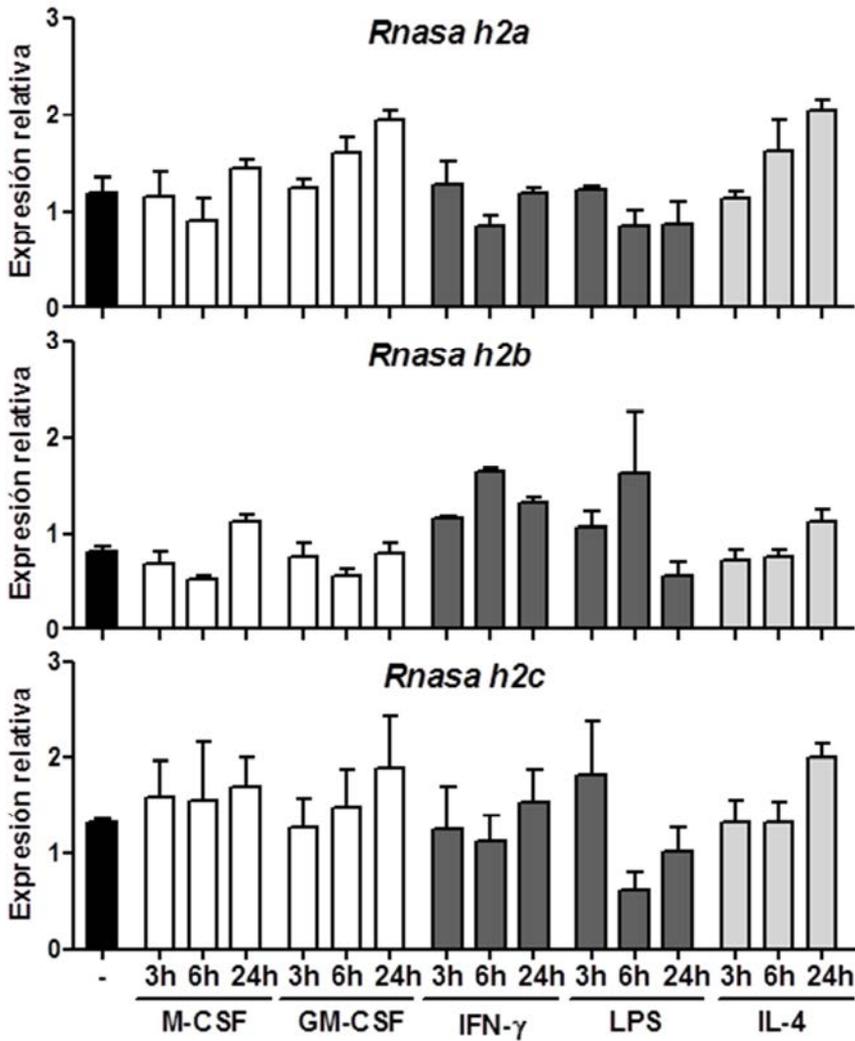


Figura 28. El complejo RNasa H2 en los macrófagos no se modifica mediante activadores o factores de crecimiento. Los macrófagos derivados de médula ósea se cultivaron en presencia de los estímulos y en los tiempos indicados. Se obtuvo el ARNm y se midió la expresión mediante PCR en tiempo real. Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

La ausencia de *Samhd1* o *Rnasa h2c* en ratones se asocia con una sobreexpresión de los genes estimulados con interferón (ISGs)

Para estudiar el rol de la proteína Samhd1 y del complejo RNasa H2 en los macrófagos, se utilizaron los modelos en ratón para el AGS, *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. El ratón *Samhd1*^{-/-} es un *knock-out* al que se le ha eliminado el exón 2 del gen *Samhd1*, lo que implica la pérdida total de la proteína. Sin embargo, dada la incompatibilidad con la vida del *knock-out* *Rnasa h2c*, se utilizó el modelo de ratón *knock-in* *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} que mimetiza la mutación R69W en pacientes con AGS. Esta mutación impide el correcto ensamblaje del complejo RNasa H2, reduciendo su actividad catalítica hasta el 35%. La pérdida total de la proteína Samhd1 y la drástica disminución de la actividad del complejo RNasa H2 no afecta a la viabilidad de los ratones. Además, no desarrollan espontáneamente ninguna enfermedad autoinmune, contrariamente a lo que se ha visto en el modelo de ratón de AGS *Trex1*^{-/-} (Morita et al., 2004b; Pereira-Lopes et al., 2013). En humanos se han definido distintos biomarcadores moleculares para el diagnóstico del AGS, como la presencia de niveles elevados de IFN- α en el líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, en los últimos años, el biomarcador más claro y fácil de detectar es la sobreexpresión de un amplio repertorio de genes estimulados por IFN de tipo I (ISGs) en las células de la sangre periférica (Rice et al., 2013b). Dada la ausencia aparente de la enfermedad en los modelos de AGS *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} se analizó la expresión de ARNm de varios ISGs.

En los pacientes que sufren AGS se encuentra afectado sobretudo el cerebro y el corazón, por lo cual para el estudio de los ISGs en nuestros modelos animales se obtuvieron muestras de estos tejidos. Concretamente se analizó la expresión de ARNm de los genes *Ifit1*, *Ifi44*, *Ifit3*, *Cxcl10*, *Ccl5* y *Oas1* mediante PCR en tiempo real. Se detectó un aumento de ARNm de los ISGs en el cerebro y en el corazón de los ratones *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (Figura 29 y Figura 30). Por lo tanto, pese a las discrepancias patológicas entre ratones y humanos respecto al AGS, estos modelos son una gran herramienta para el estudio de la función de Samhd1 y del complejo RNasa H2 en los macrófagos durante el proceso inflamatorio.

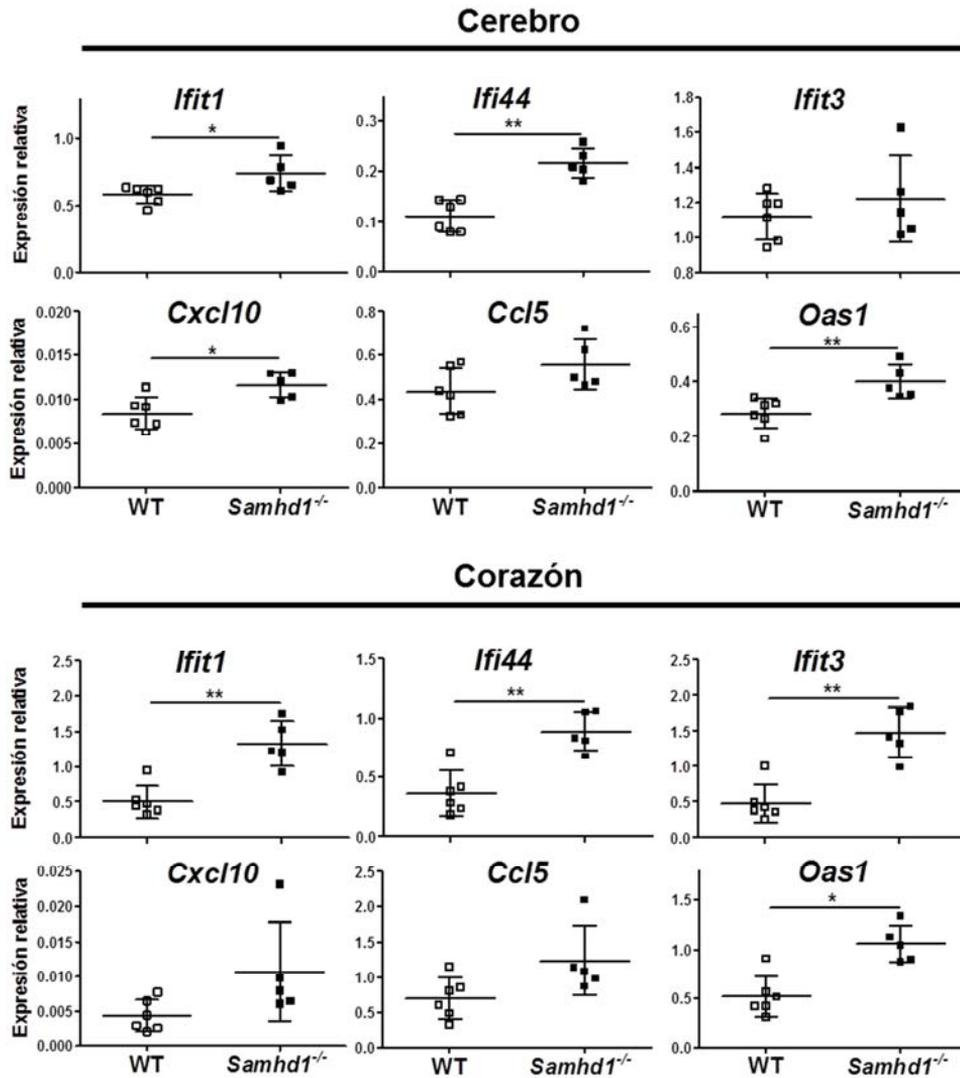


Figura 29. Sobreexpresión de ISGs en el cerebro y el corazón de los ratones *Samhd1*^{-/-}. Se obtuvo el ARNm en los tejidos indicados de los ratones *Samhd1*^{-/-} y mediante PCR en tiempo real se midió la expresión de los ISGs indicados. Los resultados se muestran de manera individual (6 WT y 5 *Samhd1*^{-/-}), media y desviación estándar. *P<0.05 y **P<0.01.

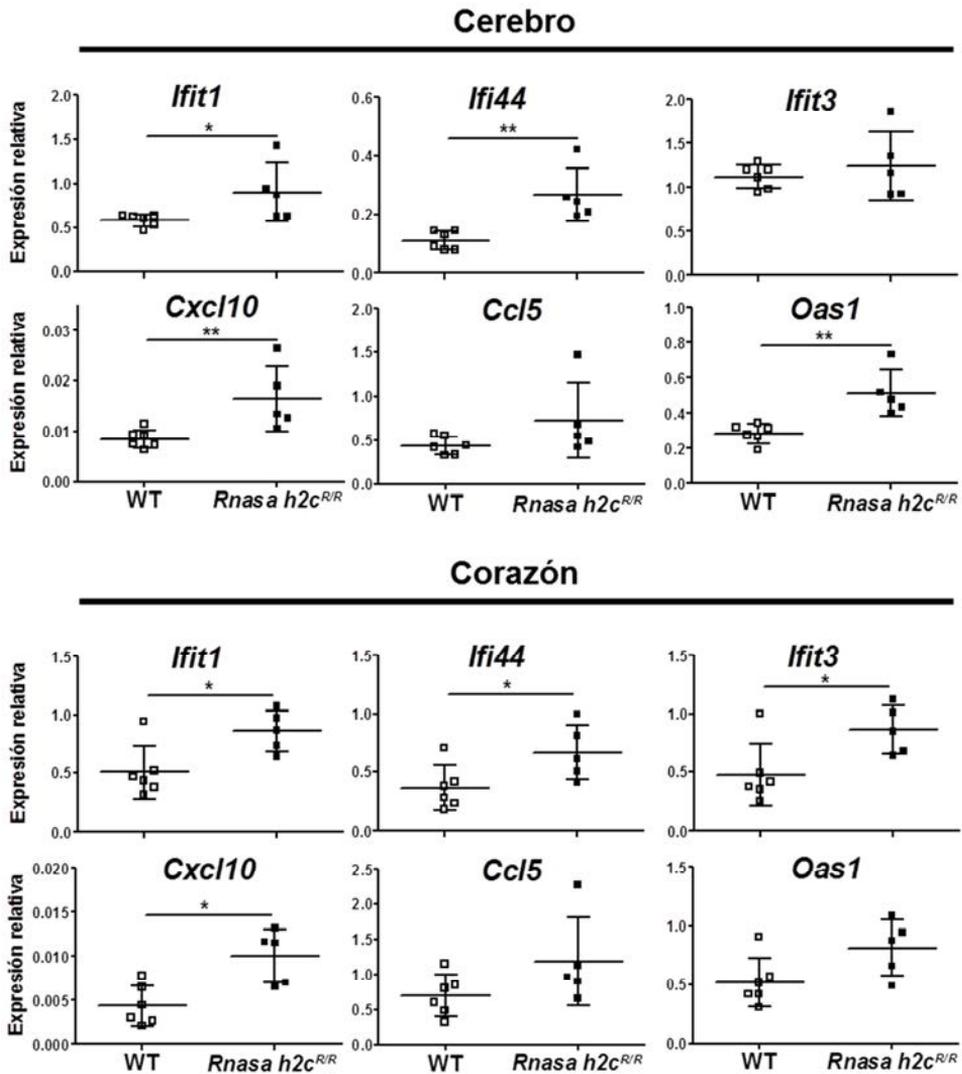


Figura 30. Sobreexpresión de ISGs en el cerebro y el corazón de los ratones *Rnasa h2c^{R69W/R69W}*. Se obtuvo el ARNm en los tejidos indicados de los ratones *Rnasa h2c^{R69W/R69W}* y mediante PCR en tiempo real se midió la expresión de los ISGs indicados. Los resultados se muestran de manera individual (6 WT y 5 *Rnasa h2c^{R69W/R69W}*), media y desviación estándar. *P<0.05 y **P<0.01.

Resultados

Una vez validados los modelos de ratón *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}, quisimos determinar si la sobreexpresión de los ISGs también sucedía en los macrófagos.

Para ello se obtuvieron macrófagos diferenciados a partir de la médula ósea de ratones WT, *Samhd1*^{-/-} o *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. Además, los cultivos fueron activados con estímulos proinflamatorios (IFN- γ o LPS) durante 24 horas. Se analizó la expresión de ARNm de los genes ISGs descritos anteriormente mediante PCR en tiempo real. En los macrófagos derivados de médula ósea de los ratones *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} no se detectó la expresión constitutiva de los ISGs. Sin embargo, en los macrófagos *Samhd1*^{-/-} activados se observó un aumento de ARNm en algunos de los ISGs analizados, solamente significativo en la expresión de *Irf4* y *Oas1* en las células activadas con LPS (Figura 31A). En los macrófagos *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} activados con estímulos proinflamatorios también se observó un aumento de ARNm de los ISGs estudiados (Figura 31B). No obstante, las diferencias no fueron significativas probablemente debido a que estos macrófagos aún conservan parte de su actividad ribonucleasa.

En definitiva, los datos mostrados hasta el momento sugieren que el macrófago puede ser un participante clave en el desarrollo de las enfermedades asociadas a mutaciones en *Samhd1* y *Rnasah2c*.

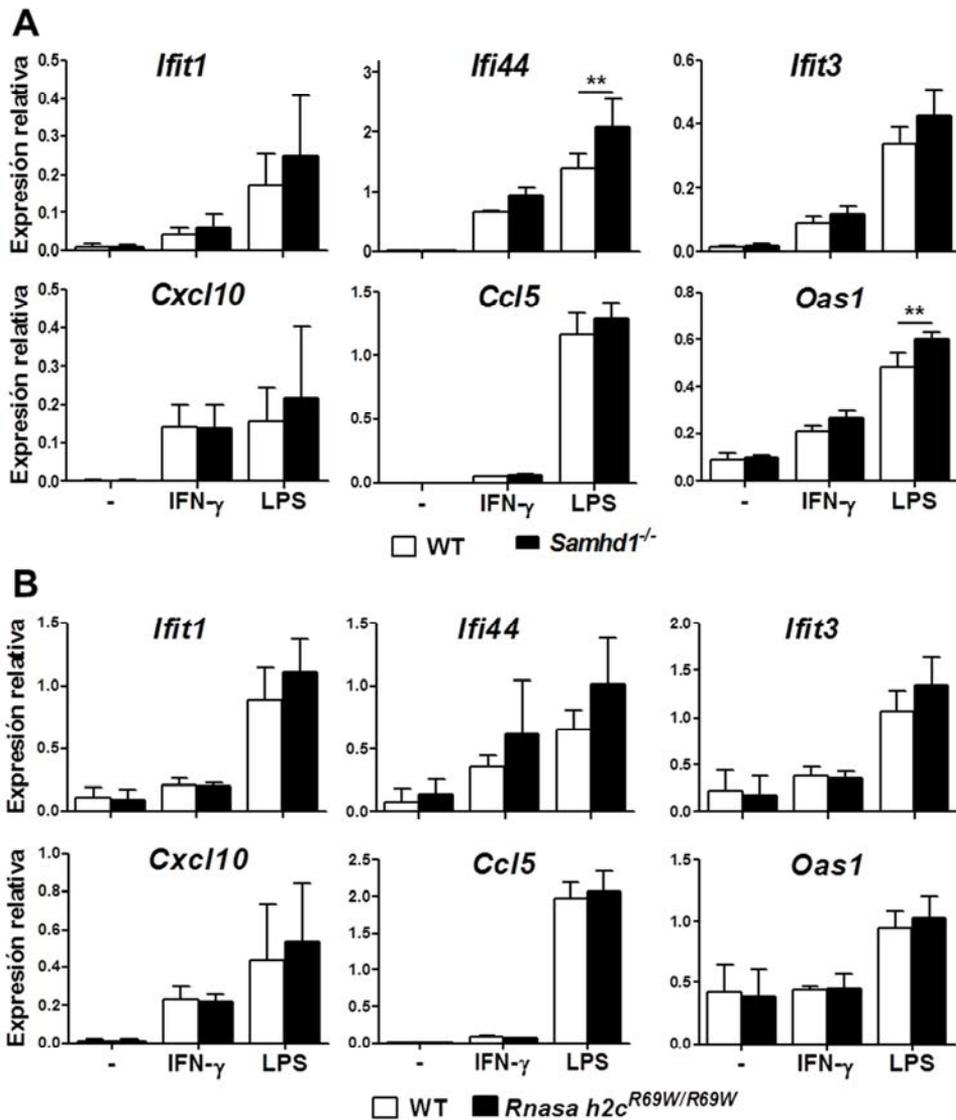


Figura 31. Sobreexpresión de ISGs en los macrófagos *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. Los macrófagos fueron activados con los estímulos indicados durante 24 horas. Se obtuvo el ARNm y mediante PCR en tiempo real se midió la expresión de los ISGs indicados en los macrófagos de ratones *Samhd1*^{-/-} (A) y de ratones *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (B). Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. *P<0.05 y **P<0.01.

Samhd1 y RNasa H2 no afectan a la diferenciación de los macrófagos derivados de la médula ósea

Para determinar el papel de Samhd1 y del complejo RNasa H2 en los macrófagos, primero quisimos evaluar el efecto de estas proteínas en la diferenciación de los macrófagos.

La generación de estas células se realizó mediante el cultivo de la médula ósea de ratones WT, *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} en medio de cultivo con el factor de diferenciación M-CSF tal y como se indica en el apartado “Materiales y métodos”. Mediante este método de generación de macrófagos in vitro se obtiene una población homogénea de macrófagos después de 7 días en cultivo (>98% CD11b). No obstante, en este ensayo se detuvo la diferenciación a los 6 días con la finalidad de detectar algún defecto en la diferenciación de los macrófagos. En primer lugar, se cuantificó el número de los macrófagos obtenidos a partir de los cultivos de la médula ósea. Después de 6 días en cultivo no se observaron diferencias con relación a los controles en el número de macrófagos obtenidos in vitro en los cultivos WT, *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (Figura 32).

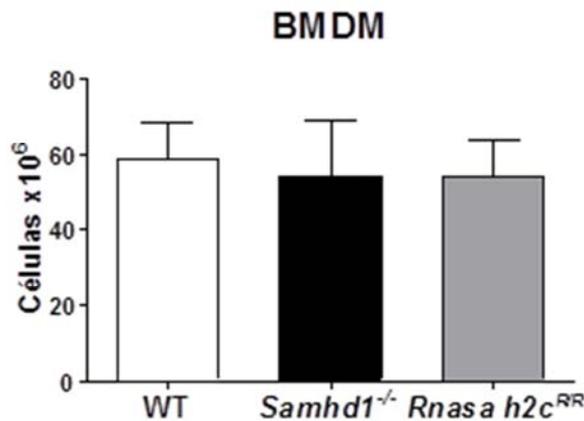


Figura 32. El número de macrófagos derivados de medula ósea no está afectado por el déficit de Samhd1 o RNasa H2. Los macrófagos fueron obtenidos de ratones WT, *Samhd1*^{-/-} o *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. Se realizó el recuento de las células a los 6 días de diferenciación en medio de cultivo con M-CSF. Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

En segundo lugar, quisimos determinar si la ausencia de la proteína Samhd1 o del complejo RNasa H2 afectaba en la diferenciación de los macrófagos.

La población de macrófagos se caracteriza por la expresión de determinados marcadores en su superficie celular. De hecho, gracias a la expresión únicamente de tres marcadores de superficie se puede identificar fácilmente a la población de macrófagos: F4/80+, CD11b+ y Ly6C-. De esta forma, mediante citometría de flujo se determinó la expresión de los marcadores mencionados en los macrófagos derivados de ratones WT, *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2cR69W/R69W*. Tras 6 días en cultivo con medio rico en M-CSF se obtuvieron alrededor de un 98% de macrófagos diferenciados en todos los cultivos. Es decir, la población de macrófagos era positiva para los marcadores F4/80 y CD11b, mientras que no expresaba en su superficie el marcador Ly6C (Figura 33A). Por otro lado, tampoco se detectaron variaciones en la densidad de los marcadores de superficie estudiados (Figura 33B).

En conjunto estos resultados indica que la deficiencia de Samhd1 o del complejo RNasa H2 no tiene un efecto en el fenotipo de los macrófagos derivados de médula ósea.

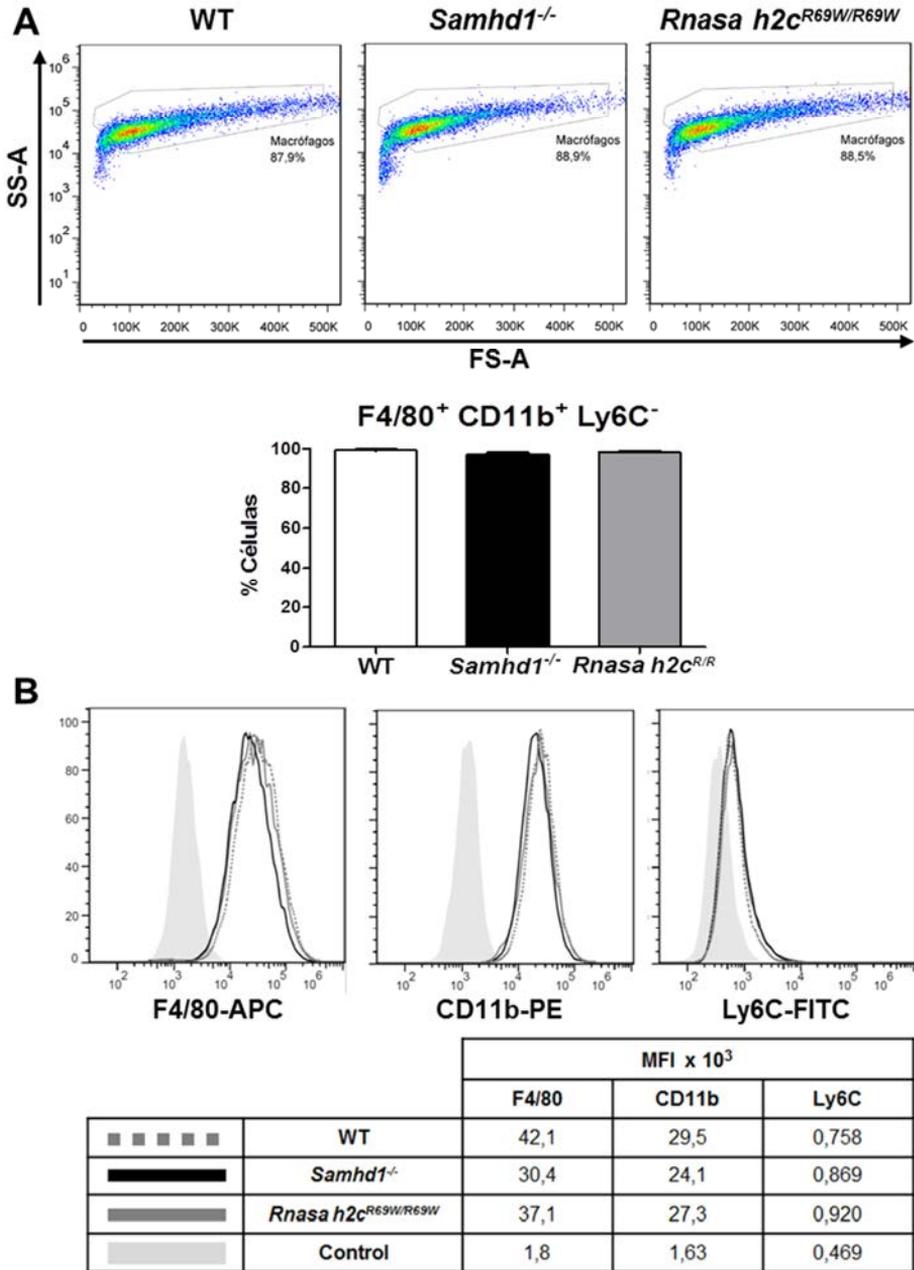


Figura 33. La diferenciación en los macrófagos no está afectada por *Samhd1* o *RNasa H2*. Macrófagos de ratones WT, *Samhd1*^{-/-} o *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. (A) Tamaño (FS-A), granularidad (SS-A) y porcentaje de macrófagos (media y desviación estándar n=3). (B) Mean fluorescence intensity (MFI) de los marcadores indicados (datos representativos n=3).

Samhd1 y RNasa H2 no afectan la proliferación de los macrófagos

Durante la proliferación celular se requiere la síntesis de ADN y ARN. Para mantener la integridad del ADN, a lo largo del ciclo celular existen distintos puntos de control que evitan la progresión del ciclo celular si el ADN está dañado. Dada las funciones atribuidas a las nucleasas Samhd1 y RNasa H2, podríamos pensar que estas proteínas serían parte de los mecanismos de reparación necesarios para el mantenimiento de la integridad genómica. Basándonos en esta hipótesis, quisimos estudiar el efecto de estas proteínas en la proliferación de los macrófagos.

A partir de la médula ósea de los ratones WT, *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} se obtuvieron macrófagos. Las células se cultivaron durante 18 horas en medio de cultivo sin factores de crecimiento. De este modo, se logra la sincronización de toda la población en la fase G0/G1 del ciclo celular. Después los macrófagos fueron estimulados con M-CSF y se analizó la proliferación a las 24 horas. Contrariamente a lo que se podía suponer inicialmente, no se hallaron cambios significativos en la proliferación de los macrófagos deficientes en Samhd1 o RNasa H2 (Figura 34).

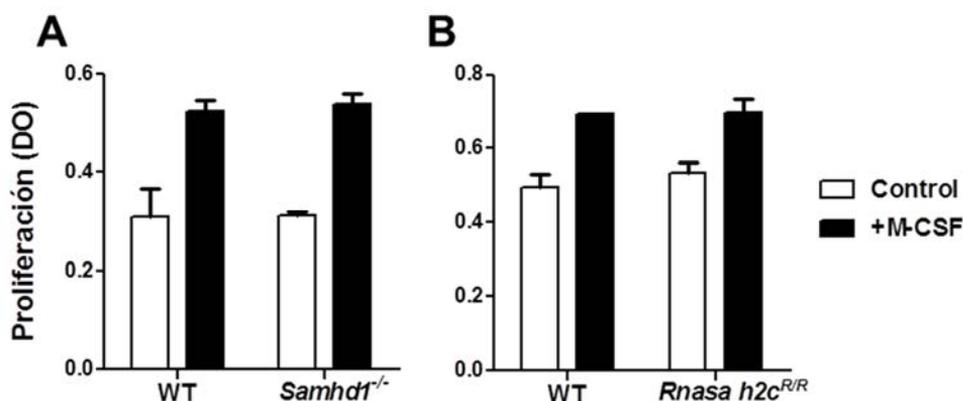


Figura 34. La proliferación en los macrófagos no está afectada por Samhd1 o RNasa H2. Los macrófagos fueron obtenidos a partir de médula ósea de ratones WT, *Samhd1*^{-/-} o *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. (A) Proliferación de los macrófagos *Samhd1*^{-/-} y (B) proliferación de los macrófagos *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

También se analizó el ciclo celular a las 24 horas de los macrófagos estimulados con M-CSF. Se fijaron las células y se tiñeron con yoduro de propidio y mediante citometría de flujo se analizó el contenido de ADN en los macrófagos de los ratones WT, *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. Tampoco se detectaron cambios en la entrada del ciclo celular (Figura 35).

En resumen, no hemos encontrado que las nucleasas *Samhd1* y RNasa H2 tengan un efecto en la proliferación dependiente de M-CSF en los macrófagos.

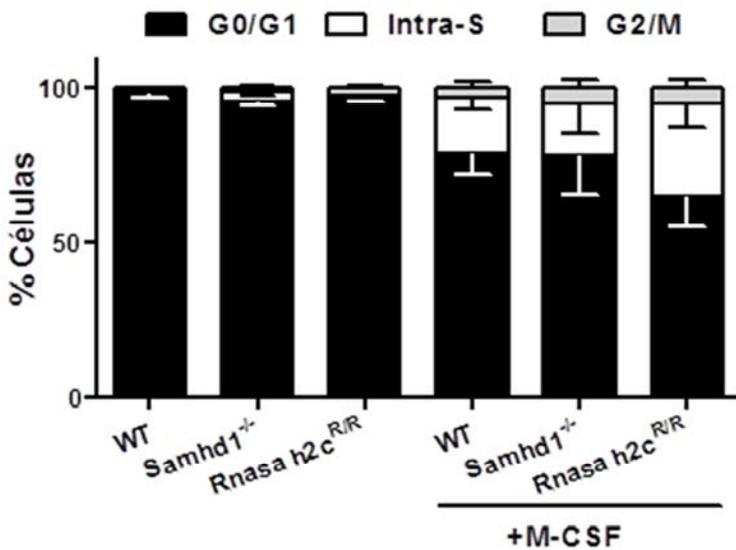


Figura 35. La progresión en el ciclo celular dependiente de M-CSF en los macrófagos no está afectada por *Samhd1* o RNasa H2. Los macrófagos fueron obtenidos a partir de médula ósea de ratones WT, *Samhd1*^{-/-} o *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. (A) Ciclo celular en los macrófagos *Samhd1*^{-/-} y (B) ciclo celular en los macrófagos *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Samhd1 y RNasa H2 no afectan la activación de los macrófagos

Durante la inflamación los macrófagos generan un ambiente altamente oxidativo capaz de dañar el ADN de las células. Este daño en el ADN induce la activación de p53, que causa la parada en el ciclo celular para facilitar la reparación del ADN, o induce la apoptosis celular cuando el daño es irreparable. Sin embargo, los macrófagos son células muy resistentes que poseen una serie de mecanismos, los cuales lo protegen de las roturas del ADN (Pereira-Lopes et al., 2015a). Las citocinas proinflamatorias que inducen la expresión de la proteína Samhd1 en los macrófagos también inhiben la proliferación de los macrófagos en la interfase G1/S del ciclo celular (Seiler et al., 2007; Xaus et al., 1999a). Por estas razones, quisimos analizar la capacidad de volver a entrar en ciclo celular de los macrófagos deficientes en Samhd1 y del complejo RNasa H2 tras la activación inducida por los estímulos proinflamatorios.

A partir de la médula ósea de ratones WT, *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} se obtuvieron macrófagos. Las células se cultivaron durante 18 horas en medio de cultivo sin factores de crecimiento para la sincronización de toda la población en la fase G0/G1 del ciclo celular. Después los macrófagos fueron tratados con estímulos proinflamatorios (IFN- γ y LPS), antiinflamatorios (IL-4) o proliferativos (M-CSF). Después de 24 horas se eliminaron los estímulos y se añadieron a los cultivos medio nuevo con M-CSF. Con el fin de valorar la capacidad de entrar en el ciclo celular se analizó la proliferación en presencia de M-CSF tras 24, 48 y 72 horas (Figura 36A). Los macrófagos procedentes de los animales controles tratados con estímulos proinflamatorios (IFN- γ y LPS), tuvieron una mayor dificultad para entrar de nuevo en el ciclo, que los tratados con estímulos antiinflamatorios (IL-4) o proliferativos (M-CSF). Este dato sugiere que la activación proinflamatoria ocasiona un daño en los macrófagos. En relación con los controles, no se detectó una disminución en la capacidad proliferativa de los macrófagos *Samhd1*^{-/-} (Figura 36B) o *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (Figura 36C) activados previamente con estímulos pro o antiinflamatorios. Por lo tanto, Samhd1 y RNasa H2 no afectan la capacidad de recuperación de los macrófagos de entrar en el ciclo celular, tras el bloqueo en la fase G1/S mediado por estímulos proinflamatorios.

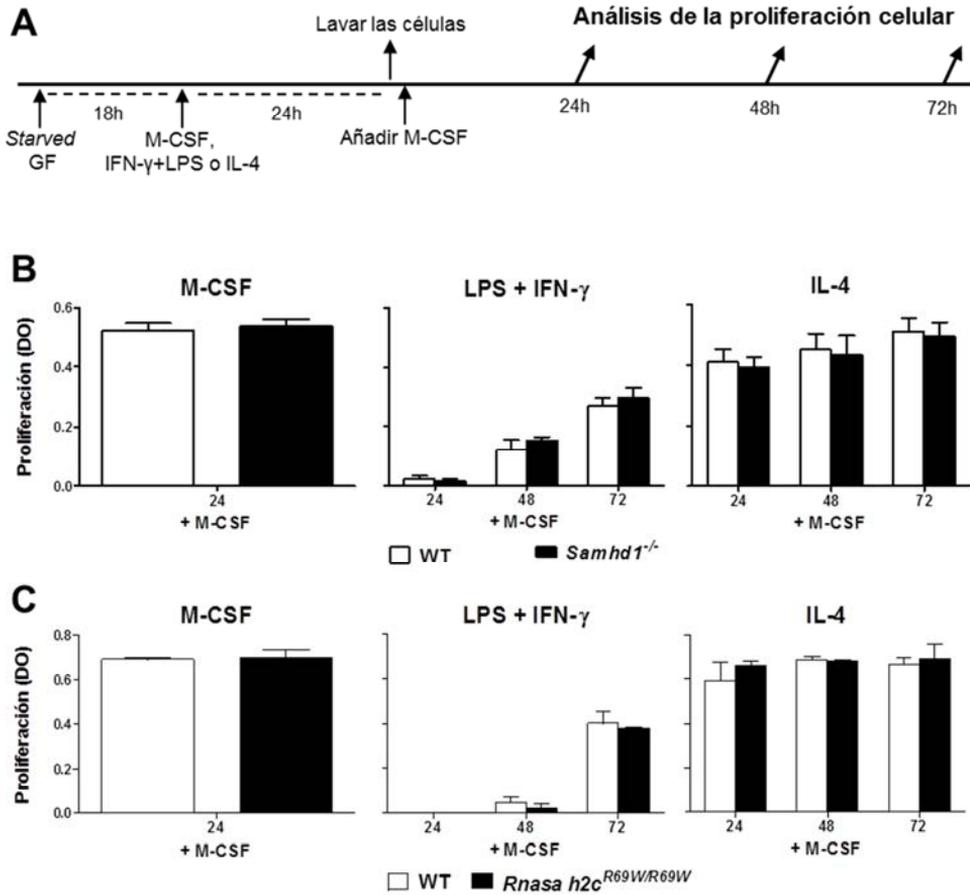


Figura 36. La proliferación en los macrófagos activados con estímulos proinflamatorios no está afectada por *Samhd1* o *RNasa H2*. Los macrófagos fueron obtenidos a partir de médula ósea de ratones WT, *Samhd1*^{-/-} o *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. Se analizó la capacidad de entrar en ciclo celular mediante un ensayo de proliferación (A). Macrófagos *Samhd1*^{-/-} (B) o *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (C). Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Por otro lado, quisimos evaluar la inducción de muerte celular en los macrófagos deficientes en *Samhd1* o *RNasa H2* producida por estímulos proinflamatorios. La viabilidad se valoró mediante el recuento de células vivas, excluyendo las que estaban teñidas con DAPI (Figura 37A). En tan solo un día los estímulos proinflamatorios indujeron una fuerte disminución en la viabilidad de los macrófagos. Además, continuó disminuyendo a lo largo del tiempo, pero a un ritmo más lento. Tras la caída inicial, los macrófagos tratados con los estímulos

proinflamatorios se mantienen, mientras que el M-CSF permite su proliferación sin aparente mortalidad tal y como habíamos descrito anteriormente (Comalada et al.). En comparación con los controles, no se detectó una disminución en la viabilidad de los macrófagos *Samhd1*^{-/-} (Figura 37B) o *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (Figura 37C).

En resumen, *Samhd1* y *RNasa H2* tampoco intervienen en los posibles daños inducidos por estímulos proinflamatorios en los macrófagos.

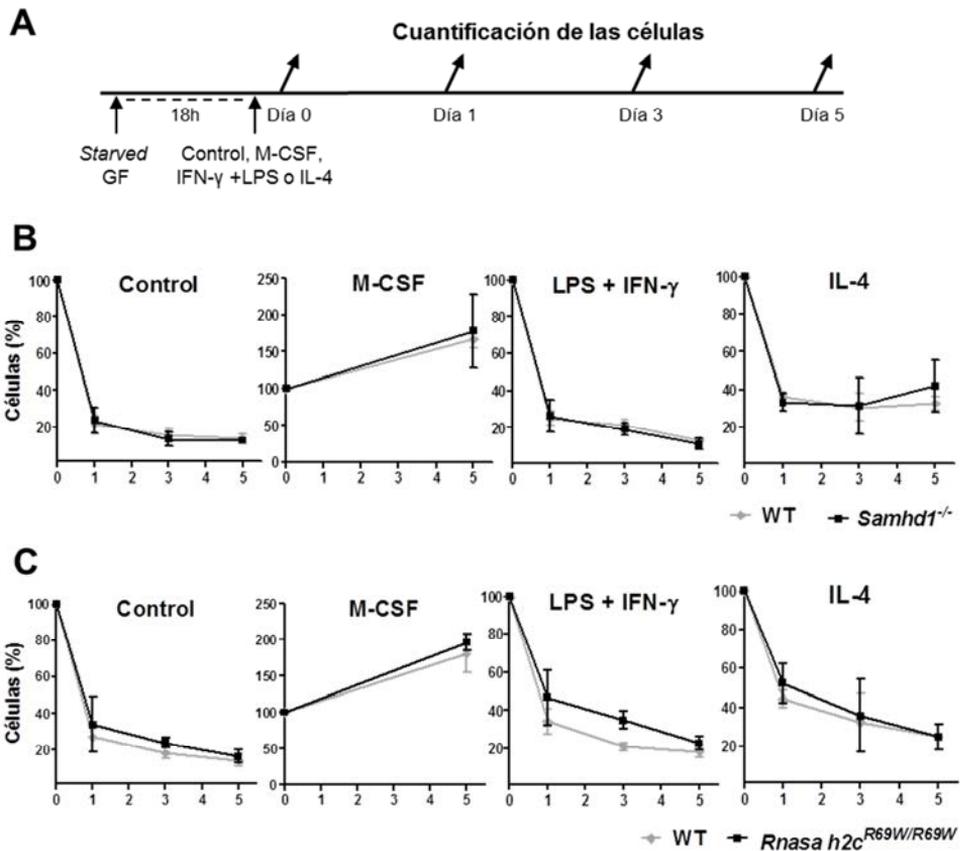


Figura 37. La carencia de *Samhd1* o *RNasa H2* no afecta la viabilidad de los macrófagos activados con estímulos proinflamatorios. Los macrófagos fueron obtenidos a partir de médula ósea de ratones WT, *Samhd1*^{-/-} o *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. Se cuantificó el número de células en los días indicados con un *Cell Counter* (A). Macrófagos *Samhd1*^{-/-} (B) y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (C). Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Samhd1 y RNasa H2 no afectan la activación proinflamatoria de los macrófagos

Una activación proinflamatoria excesiva por parte de los macrófagos puede ocasionar daño en los tejidos e incluso enfermedades de carácter crónico (Laskin et al., 2011; Pereira-Lopes et al., 2013). Por ello quisimos examinar el efecto de la ausencia de Samhd1 o del complejo RNasa H2 en la activación proinflamatoria de los macrófagos.

Se estudió la respuesta de los macrófagos deficientes en Samhd1 o el complejo RNasa H2 mediante la estimulación del receptor TLR4 y del IFNGR. Se obtuvieron macrófagos de los ratones WT, *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. Posteriormente, se incubaron los macrófagos con el estímulo proinflamatorios (LPS o IFN- γ). Se extrajo el ARN, y mediante PCR en tiempo real se determinaron los niveles de ARNm de varios genes proinflamatorios, como son *Nos2*, *Tnf- α* , *Il-6* e *Il-1 β* . No obstante, no detectamos diferencias significativas en relación con los controles en la expresión de los genes estudiados en los macrófagos *Samhd1*^{-/-} (Figura 38A y C) o *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (Figura 38B y D). Además, tampoco detectamos diferencias en la expresión de los genes antiinflamatorios *Arg1* y *Fizz1* en macrófagos *Samhd1*^{-/-} (Figura 39A) o *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (Figura 39B) activados con IL-4, en relación con los controles.

Con estos resultados pudimos concluir que Samhd1 y RNasa H2 no afectan en la activación proinflamatoria de los macrófagos mediante los estímulos LPS e IFN- γ .

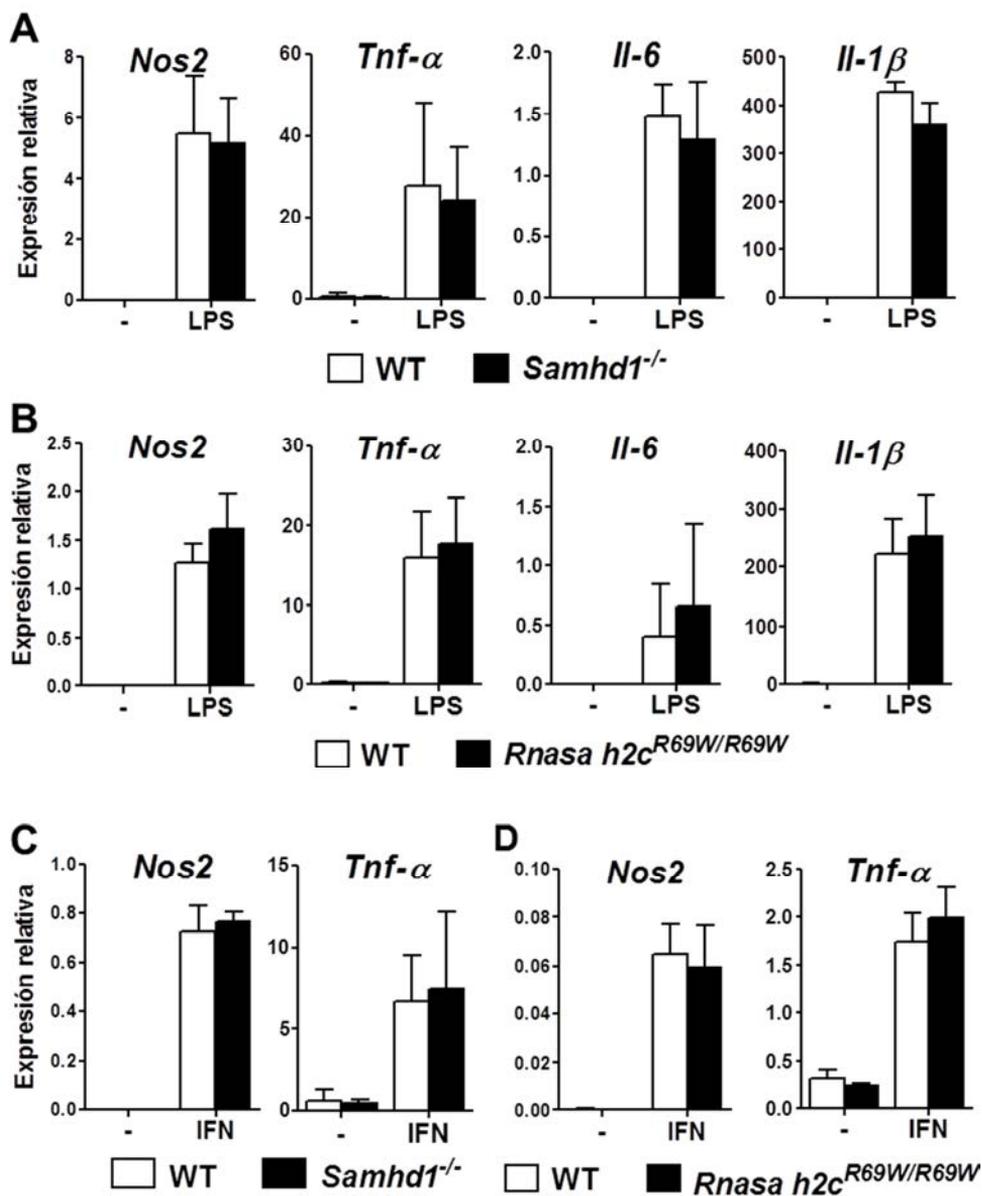


Figura 38. *Samhd1* y *RNasa H2* no afectan la activación proinflamatoria de los macrófagos. Expresión relativa de ARNm de los genes indicados en los macrófagos de los ratones *Samhd1*^{-/-} (A y C) y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (B y D). Los macrófagos fueron activados con IFN-γ o LPS durante 6 horas. Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

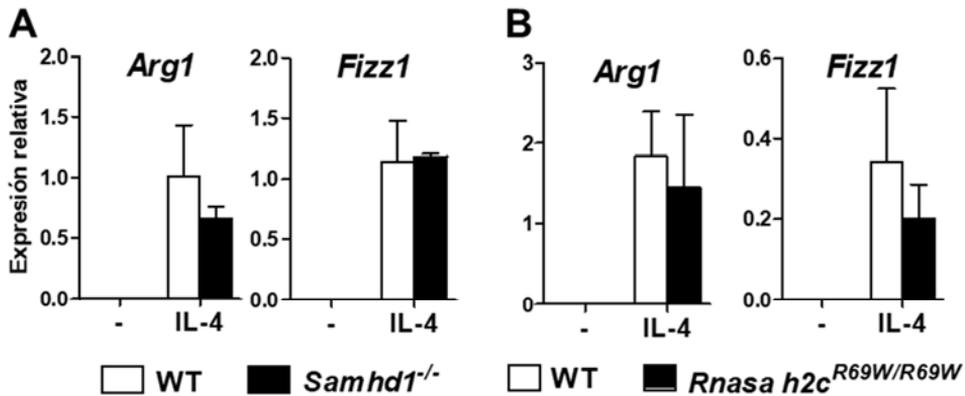


Figura 39. *Samhd1* y *RNasa H2* no afectan la activación antiinflamatoria de los macrófagos. Expresión relativa de ARNm de los genes indicados en los macrófagos de los ratones *Samhd1*^{-/-} (A) y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (B). Los macrófagos fueron activados con IL-4 durante 6 horas. Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

***Samhd1* y *RNasa H2* protegen del daño en el ADN causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) en los macrófagos**

Los macrófagos activados con estímulos proinflamatorios producen grandes cantidades de ROS generando un ambiente oxidativo capaz de dañar el ADN (Colonna, 2015). La ausencia de las actividades enzimáticas de *Samhd1* y *RNasa H2* podría propiciar la acumulación de daño en el ADN. Los macrófagos son las células que más ROS producen, y por lo tanto las más expuestas a los efectos dañinos de las ROS. Por ello, quisimos estudiar el efecto en el daño en el ADN de las nucleasas *Samhd1* y *RNasa H2* en los macrófagos proinflamatorios. El daño en el ADN induce las vías de señalización mediadas por ATM/CHK2 o ATR/CHK1 dependiendo del tipo de daño. No obstante, ambas vías culminan en la activación de p53. Cuando se produce daño en el ADN el inhibidor de las ciclinas cdk p21^{waf-1}, diana de p53, es el encargado de detener el ciclo celular. De esta forma, el aumento en la expresión del gen *p21*^{waf-1} indica el bloqueo en el avance del ciclo celular en la interfase G1/S y la regulación negativa del proceso de apoptosis (Karimian et al., 2016a; Xaus et al., 2001).

Se obtuvieron macrófagos a partir médula ósea de ratones WT, *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. Los macrófagos fueron tratados con estímulos proliferativos

(M-CSF) y proinflamatorios (IFN- γ o LPS). Finalmente se determinaron los niveles de ARNm del gen $p21^{waf-1}$ mediante PCR en tiempo real. Se observó un incremento en la expresión del gen $p21^{waf-1}$ en los macrófagos $Samhd1^{-/-}$ tratados con estímulos proliferativos o proinflamatorios. No obstante, este aumento solo se mostró significativo en los macrófagos activados con el estímulo proinflamatorio IFN- γ (Figura 40A). También se observó un ligero incremento en los niveles de ARNm del gen $p21^{waf-1}$ en los macrófagos $Rnasa h2c^{R69W/R69W}$ en respuesta al daño en el ADN (Figura 40B).

Por lo tanto, las nucleasas $Samhd1$ y $Rnasa H2$ podrían formar parte de los mecanismos de protección de los macrófagos durante la inflamación.

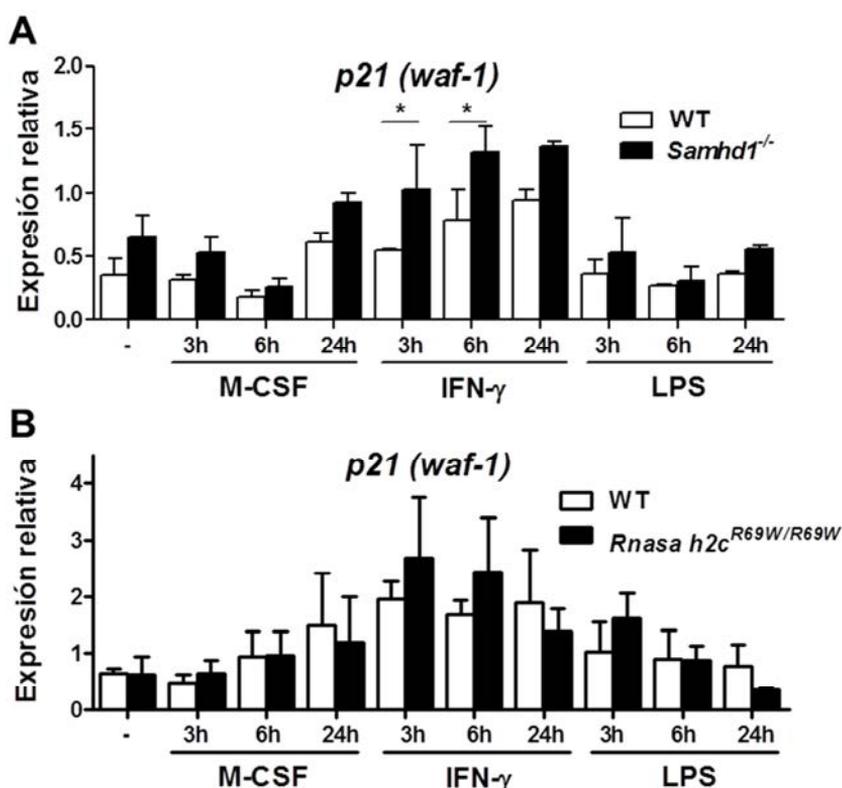


Figura 40. Incremento de la expresión de $p21^{waf-1}$ en los macrófagos $Samhd1^{-/-}$ y $Rnasa h2c^{R69W/R69W}$. Expresión relativa de ARNm del gen $p21^{waf-1}$ en los macrófagos de los ratones $Samhd1^{-/-}$ (A) y de los ratones $Rnasa h2c^{R69W/R69W}$ (B). Los macrófagos fueron tratados con los estímulos y durante los tiempos indicados. Los resultados se muestran como media y desviación estándar de 3 experimentos independientes. $P < 0.05$.

Las roturas en el ADN son reconocidas por proteínas que median la respuesta al daño en el ADN. Una de estas proteínas es la histona γ -H2AX que detecta sobre todo las roturas en el ADN, de doble cadena (DSBs), y se fosforila rápidamente en la Ser 139 para mediar la respuesta por las vías dependientes de las quinasas ATM y ATR. Es decir, que la fosforilación de γ -H2AX es un marcador de daño en el ADN rápido y que se correlaciona con las roturas del ADN. La detección de γ -H2AX es un método muy sensible que se utiliza para examinar el daño en el ADN y su sucesiva reparación. La fosforilación de γ -H2AX también se puede producir durante la replicación del ADN, como consecuencia de la apoptosis o del daño en ADN basal, y no solo en las roturas DBSs. Por lo tanto, durante el análisis de los *focis* de γ -H2AX es importante determinar la cinética, el número, el tamaño y la morfología de los *focis* (Georgoulis et al., 2017; Sharma et al., 2012)

En los macrófagos la expresión de *Samhd1* se induce mediante estímulos proinflamatorios, obteniéndose altos niveles de proteína después de 24 horas. Esto sugiere que *Samhd1* podría tener un papel importante en el daño en el ADN causado por los estímulos proinflamatorios. A partir médula ósea de los ratones WT y *Samhd1*^{-/-} se obtuvieron macrófagos. Las células fueron tratadas con estímulos proinflamatorios (IFN- γ o LPS) durante 24 horas. A continuación, se analizó el daño en el ADN a través de la fosforilación de γ -H2AX mediante el uso de anticuerpos conjugados con fluorocromos. Se tomaron fotografías mediante un microscopio confocal, y se realizaron secciones ópticas de 0,5 micras para la determinación de los *focis* nucleares de γ -H2AX. Con el fin de obtener la distribución de los *focis* en los distintos tratamientos, se cuantificaron de manera automatizada en cada célula. En los resultados se observa un incremento *focis* nucleares de γ -H2AX, sugiriendo la producción del daño en el ADN en los macrófagos *Samhd1*^{-/-} activados con los estímulos proinflamatorios IFN- γ y LPS (Figura 41).

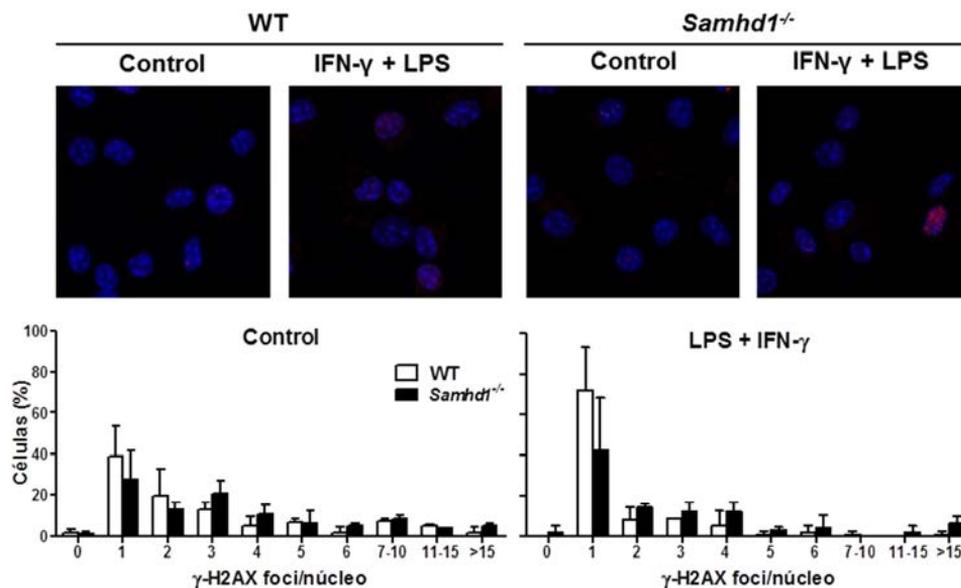


Figura 41. *Samhd1* protege a los macrófagos del daño en el ADN causado por estímulo proinflamatorios. Los macrófagos fueron obtenidos a partir de la médula ósea de ratones WT y *Samhd1*^{-/-}. Las células fueron activadas con los estímulos proinflamatorios IFN-γ y LPS durante 24 horas. Se analizó el daño en el ADN a través de la fosforilación de γ-H2AX mediante microscopía confocal. Para cada condición se hicieron 4 fotografías aleatorias (+/- 40 células). Los resultados se muestran como número de *focis* por núcleo en las células contadas (%). Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 2 experimentos independientes.

Por otro lado, también se analizó el daño en el ADN causado por estímulos proinflamatorios en los macrófagos derivados de médula ósea de ratones *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. El complejo RNasa H2 se expresa en tejidos con alta infiltración de macrófagos, y su expresión es constitutiva. De hecho, la pérdida total de su actividad enzimática es incompatible con la vida. Por estas razones, en esta ocasión los macrófagos fueron tratados con estímulos proliferativos (M-CSF) y proinflamatorios (IFN-γ o LPS) durante 6 horas. En los resultados se observa un incremento significativo en el daño en el ADN en los macrófagos *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} activados con los estímulos proinflamatorios IFN-γ o LPS (Figura 42).

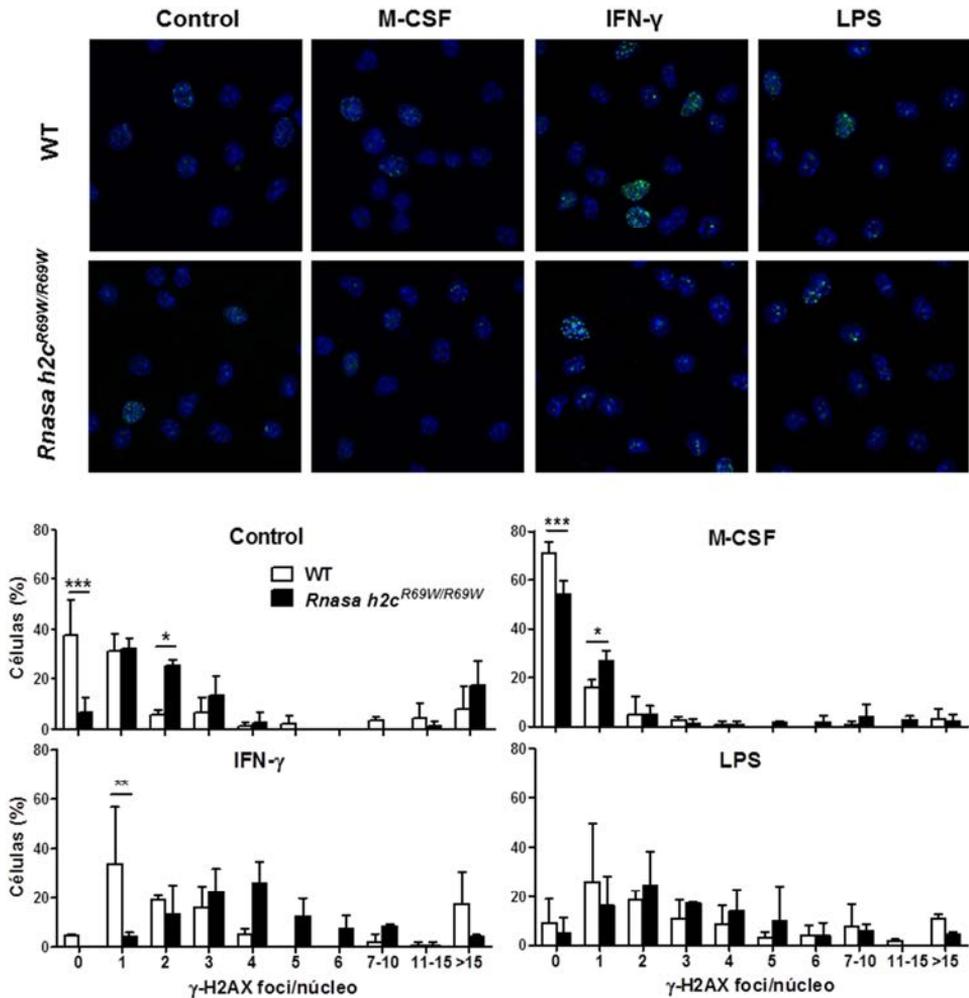


Figura 42. RNasa H2 protege a los macrófagos del daño en el ADN causado por estímulos proinflamatorios. Los macrófagos fueron obtenidos a partir de médula ósea de ratones WT y *Rnasa h2c^{R69W/R69W}*. Los macrófagos fueron activados con estímulos proliferativos (M-CSF) o proinflamatorios (IFN-γ o LPS) durante 6 horas. Se analizó el daño en el ADN a través de la fosforilación de γ-H2AX mediante microscopía confocal. Para cada condición se hicieron 4 fotografías aleatorias (+/- 40 células). Se muestra el número de *focis* por núcleo en las células contadas (%). Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 2 experimentos independientes. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001.

Los estímulos proinflamatorios, como son el IFN- γ y el LPS, inducen la generación de las ROS en los macrófagos (Covarrubias et al., 2013; Tan et al., 2016). Por consiguiente, quisimos determinar si el daño en el ADN observado en los macrófagos *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} era debido a las ROS. Para ello, se utilizó un quelante de las ROS, el N-acetil-L-cisteína (NAC). En los macrófagos activados con agentes proinflamatorios WT y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}, tratados previamente con NAC, se observó una disminución en el daño en el ADN (Figura 43).

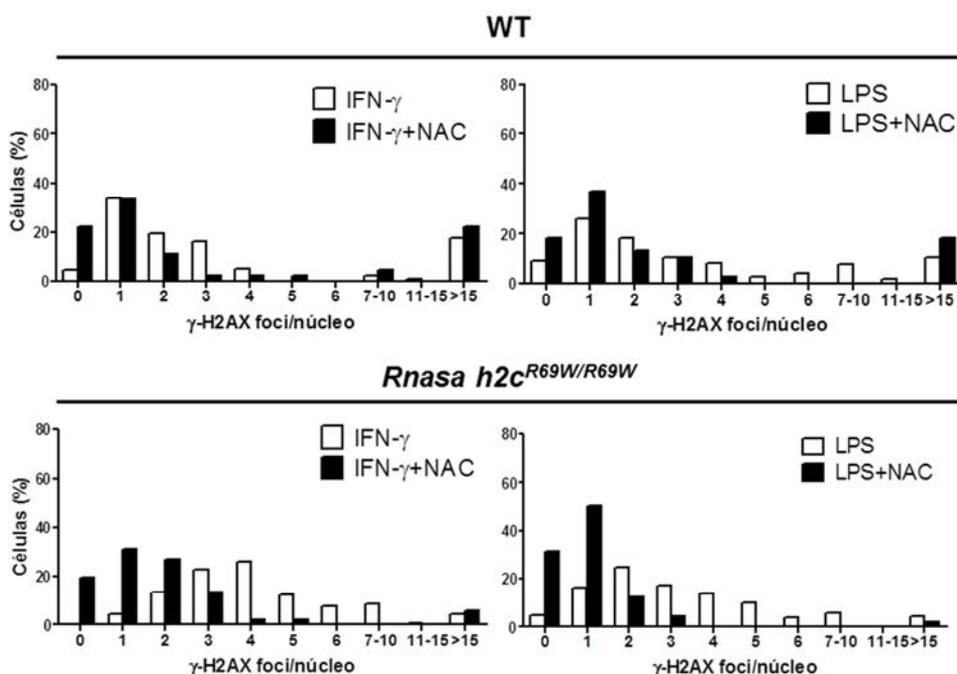


Figura 43. El daño en el ADN en los macrófagos activados por agente proinflamatorios se debe a la producción de las ROS. Los macrófagos fueron obtenidos a partir de médula ósea de ratones WT y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}. Los macrófagos fueron tratados previamente con NAC (10mM) y activados con los estímulos proinflamatorios indicados durante 6 horas. Se analizó el daño en el ADN a través de la fosforilación de γ -H2AX mediante microscopia confocal. Para cada condición se hicieron 4 fotografías aleatorias (+/- 40 células). Se muestra el número de *focis* por núcleo en las células contadas (%). Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

En resumen, estos resultados señalan a las ROS como la causa del daño en el ADN en los macrófagos proinflamatorios. Además, una deficiencia en Samhd1 o en el complejo RNasa H2 induce la acumulación de daño en el ADN de los macrófagos. Por lo tanto, estas proteínas confieren protección a los macrófagos proinflamatorios frente al daño en el ADN inducido por la presencia de las ROS.

Samhd1 y RNasa H2 no afectan en el metabolismo de las ROS

Una alteración en el mecanismo que controla la producción o la eliminación de las ROS, puede incrementar los niveles de las ROS, generar estrés oxidativo en las células y consecuentemente provocar daños en el ADN (Mittal et al., 2013; Ponath and Kaina, 2017b). Anteriormente se ha mostrado que en los macrófagos deficientes en Samhd1 y RNasa H2 activados con estímulos proinflamatorios, se induce la acumulación de roturas en el ADN debido al incremento de las ROS. De hecho, el aumento en la producción de las ROS por parte de los propios macrófagos podría ser la causa del daño en su ADN. Por lo tanto, quisimos determinar el efecto de Samhd1 y RNasa H2 en la producción de las ROS.

Se obtuvieron macrófagos como hemos descrito y fueron tratados con estímulos proinflamatorios (IFN- γ o LPS) durante 6 horas. Posteriormente, para determinar la producción de las ROS mediante citometría de flujo, se tiñeron las células con diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA) (Eruslanov and Kusmartsev, 2010). No detectamos ningún aumento en la producción de las ROS por parte de los macrófagos carentes de Samhd1 o RNasa H2 (Figura 44).

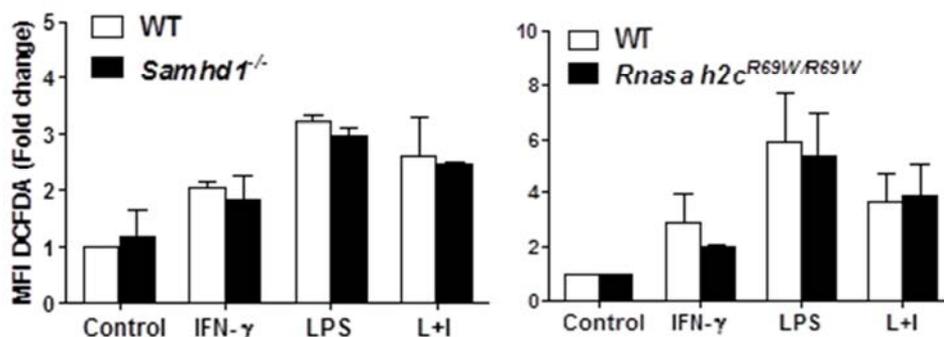


Figura 44. *Samhd1* y *RNasa H2* no afectan en la producción de las ROS en los macrófagos. Los macrófagos de los ratones WT, *Samhd1*^{-/-} y *RNasa h2c*^{R69W/R69W} y fueron activados con los estímulos indicados durante 6 horas. Se analizó la producción de las ROS mediante el uso de DCF-DA y citometría de flujo. Los resultados muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Por otro lado, las células para evitar los daños producidos por las ROS tienen varios mecanismos de eliminación y transformación de éstas, como son las enzimas Superóxido dismutasa (SOD) y la Catalasa (CAT). Quisimos estudiar si *Samhd1* o *RNasa H2* podrían tener un efecto en los mecanismos de eliminación de las ROS, propiciando un ambiente oxidativo capaz de dañar el ADN de los macrófagos. Se determinaron los niveles de ARNm de los genes *Catalasa*, *Sod1* (citoplasma) y *Sod2* (mitocondria) en los macrófagos procedentes de los animales WT, *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}, tratados con estímulos proinflamatorios (IFN-γ o LPS) durante 6 horas. No obstante, no se detectaron diferencias en la expresión de estos genes por lo que los mecanismos de eliminación de las ROS no están afectados por la ausencia de *Samhd1* o *RNasa H2* (Figura 45).

En conjunto estos resultados indican que *Samhd1* y *RNasa H2* no afectan en los mecanismos asociados a la producción o eliminación de las ROS por parte de los macrófagos. Por lo cual, estas proteínas podrían intervenir en otros procesos, como son los mecanismos de reparación del ADN.

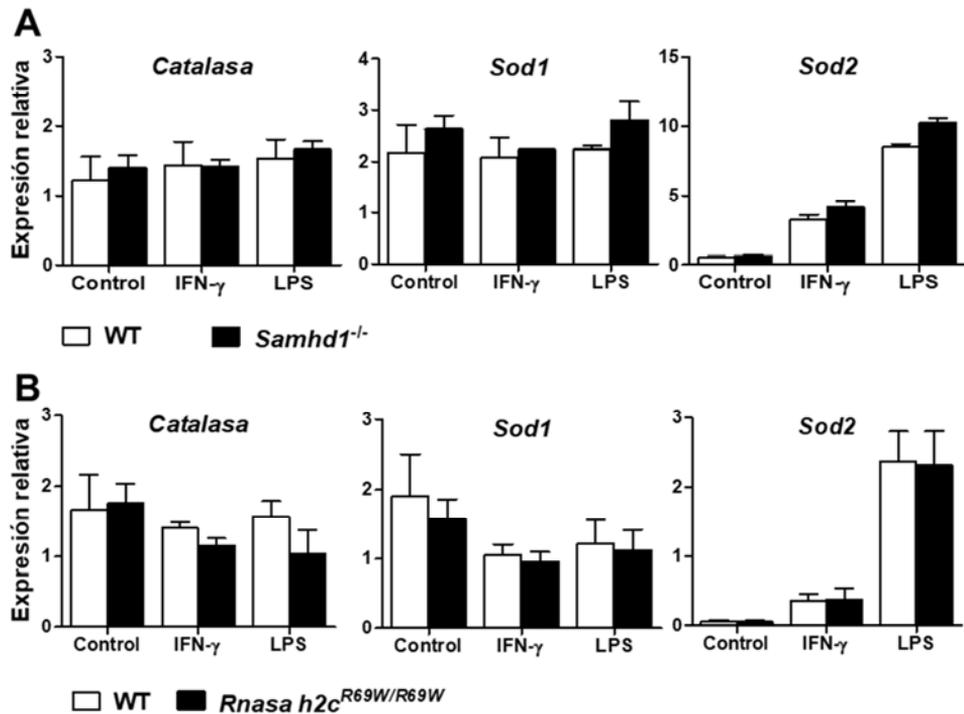


Figura 45. *Samhd1* y RNasa H2 no afectan en la eliminación de las ROS en los macrófagos proinflamatorios. Expresión relativa de ARNm de los genes indicados en los macrófagos de ratones *Samhd1*^{-/-} (A) y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (B). Los macrófagos fueron tratados con los estímulos indicados durante 6 horas. Los resultados se muestran como media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Samhd1 y RNasa H2 en enfermedades autoinmunes y en inflamación

La ausencia de Samhd1 aumenta la severidad del modelo EAE

En el síndrome de Aicardi-Goutières se han descrito mutaciones que implican la pérdida total de las funciones de *Samhd1*, o parcial en el caso del complejo RNasa H2. En la mayoría de los casos los síntomas del AGS suelen aparecer durante el primer año de vida. No obstante, aún no se conocen los detonantes que provocan la aparición de la enfermedad ya que algunos sujetos que tienen las mutaciones no experimentan ninguna patología (Crow et al., 2015). Éste

podría deberse a un factor exógeno y/o al propio *background* genético del individuo.

Los ratones *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} pese a tener sobreexpresados distintos ISGs en cerebro y corazón, no presentan el fenotipo del AGS que se observa en humanos. Ésto podría deberse a una cuestión de tiempo, y si los ratones tuvieran dos años o estuvieran expuestos a agresiones externas que no hay en estabularios libres de gérmenes, podría desarrollarse la enfermedad. De hecho, la ausencia de la enfermedad podría deberse a la falta de un detonante exógeno. Así pues, en nuestro grupo decidimos utilizar el modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE) en ratones *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W}, tal y como se indica en el apartado “Materiales y métodos”. En este modelo se producen lesiones que también encontramos en los pacientes con AGS, como son la autoinmunidad y la inflamación cerebral. Durante el desarrollo del modelo de EAE los ratones se valoraron diariamente en doble ciego a través de un *score* clínico, un *score* de efectos secundarios y el peso. A los 22 días de la inducción del modelo los ratones fueron sacrificados.

En los ratones *Samhd1*^{-/-} se observa una progresión más rápida del modelo de EAE que en los ratones WT, tal y como se muestra en el *score* clínico, la pérdida de peso y la supervivencia (Figura 46). Por lo tanto, la ausencia de *Samhd1* agrava la respuesta autoinmune y la inflamación cerebral en ratones con EAE.

Sin embargo, no observamos este patrón en los ratones *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} (Figura 47). Parece ser que la disminución en la función del complejo RNasa H2 que padecen estos ratones no es suficiente para ver aumentada la severidad del modelo.

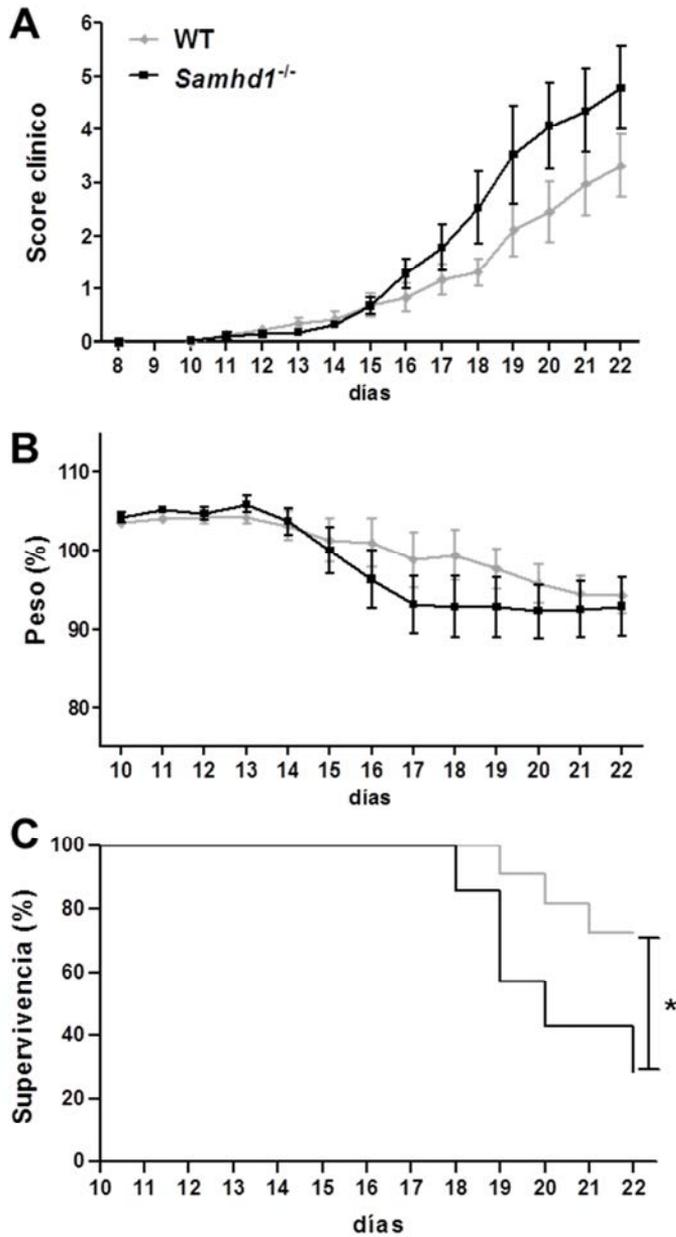


Figura 46. La ausencia de *Samhd1* aumenta la severidad del modelo EAE. Análisis del score clínico (A), porcentaje del peso inicial (B) y supervivencia (C) tras la inducción del modelo EAE en ratones WT (n=11) y *Samhd1*^{-/-} (n=7). Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. *P<0.05.

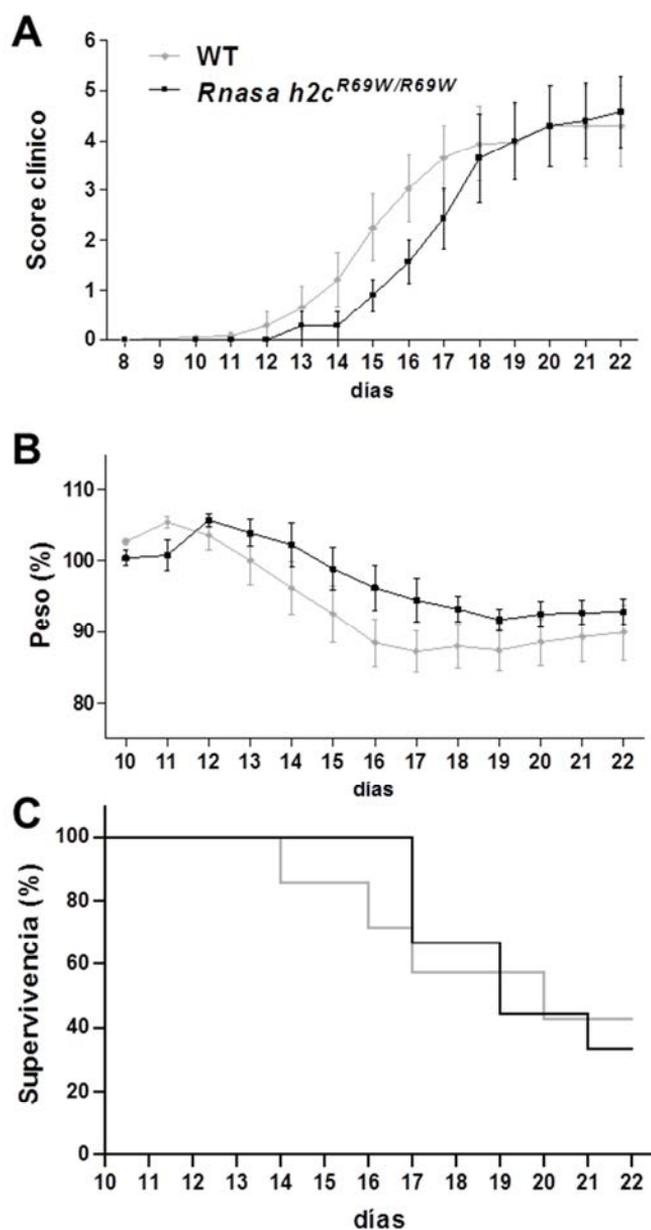


Figura 47. La deficiencia parcial de RNasa H2 no influye en la severidad del modelo EAE. Análisis del score clínico (A), porcentaje del peso inicial (B) y supervivencia (C) tras la inducción del modelo EAE en ratones WT (n=7) y *Rnasa h2c^{R69W/R69W}* (n=7). Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

Discusión

Los macrófagos participan activamente durante la respuesta inflamatoria. En primer lugar, intervienen los macrófagos activados por la vía clásica (M1) con actividad proinflamatoria, y en segundo lugar los macrófagos activados por la vía alternativa (M2) con actividad antiinflamatoria. Los macrófagos con actividad proinflamatoria son los encargados de fagocitar el material ajeno, los restos celulares y los cuerpos apoptóticos. Además, producen mediadores proinflamatorios, como son las citocinas, necesarios durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Tras la fagocitosis de los patógenos, los restos celulares y los cuerpos apoptóticos, esta respuesta tan destructiva deja de ser necesaria. En este momento los macrófagos adquieren actividades antiinflamatorias y se induce la resolución mediante la liberación de mediadores antiinflamatorios, dando inicio a los procesos de reparación y cicatrización del tejido dañado (Mantovani et al., 2002; Valledor et al., 1998). Por lo tanto, los macrófagos son capaces de modular la respuesta inflamatoria. Por ello sus actividades pro y antiinflamatoria deben estar finamente reguladas. De hecho, la actividad excesiva por parte de los macrófagos proinflamatorios o antiinflamatorios puede provocar daño en los tejidos y la aparición de enfermedades crónicas (Laskin et al., 2011; Valledor et al., 2010).

En el foco inflamatorio se genera un microambiente tóxico con el objetivo de eliminar a los agentes infecciosos. Es lógico pensar que los macrófagos que llegan al foco inflamatorio donde ejercen sus actividades proinflamatorias y más adelante antiinflamatorias, dispongan de mecanismos que les permitan sobrevivir. Nuestro grupo demostró que la activación de los macrófagos con LPS puede inducir su propia apoptosis (Xaus et al., 2000). Sin embargo la activación de estas células con IFN- γ inhibe la apoptosis a través de la expresión de del gen $p21^{waf-1}$, un inhibidor de CDK (Xaus et al., 1999a). También se demostró que el IFN- γ induce la expresión del receptor de adenosina A2B como mecanismo de desactivación de los macrófagos (Xaus et al., 1999b). Así pues, existen distintos mecanismos que controlan el exceso de activación de estas células e inducen su desactivación (Valledor et al., 2010).

Durante la inflamación se producen grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS), que no solo actúan como mediadores proinflamatorios, sino

que además son un arma muy poderosa a la hora de eliminar a los agentes infecciosos. Además, pueden causar efectos colaterales sobre las células. De hecho, la alteración en el metabolismo de las ROS puede causar daño en los componentes celulares. Por ejemplo, en la inflamación crónica la producción de las ROS no cesa generando un ambiente altamente oxidativo capaz de oxidar proteínas, constituyentes celulares lipídicos y dañar el ADN (Nathan and Cunningham-Bussel, 2013). Los neutrófilos participan en la producción de las ROS durante la respuesta inflamatoria. No obstante, al tener una vida media muy corta solamente intervienen en una etapa muy temprana de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, los macrófagos permanecen durante toda la respuesta produciendo grandes cantidades de ROS a través de la NADH oxidasa y de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias. Por lo tanto, las ROS producidas por los macrófagos durante la inflamación son las responsables de causar el daño en los componentes celulares (Ponath and Kaina, 2017a). No obstante, pese a estar directamente expuestos a los efectos dañinos de las ROS los macrófagos son células muy resistentes. Esto es debido a que cuando los macrófagos son activados con estímulos proinflamatorios, también se inducen una serie de mecanismos de reparación para protegerse de las roturas del ADN causadas por las ROS (Colonna, 2015; Pereira-Lopes et al., 2015a).

En nuestro grupo se han estudiado distintas proteínas cuyas actividades intervienen en el metabolismo de los ácidos nucleicos, como son la ADN Polimerasa- μ , Nbs1 y Trex1. La ADN Polimerasa- μ participa en los mecanismos de reparación del ADN (Gozalbo-Lopez et al., 2009), la proteína Nbs1 forma parte del complejo MRE11-RAD50-NBS1 (MRE) que reconoce las roturas de doble cadena (DSBs) (Paull and Gellert, 1998) y la exonucleasa Trex1 previene el daño en el ADN (Yang et al., 2007). En nuestro grupo se detectó un incremento en el daño el ADN en los macrófagos activados con estímulos proinflamatorios deficientes en la ADN Polimerasa- μ (datos no publicados), tal y como se ha visto en otros tipos celulares (Baleriola et al., 2016). También se demostró que el déficit de NBS1 en los macrófagos causa la acumulación de roturas en su ADN. Además, los macrófagos presentaron una disminución en la

proliferación, y un aumento en la senescencia y en la secreción de citocinas proinflamatorias (Pereira-Lopes et al., 2015a). Por otro lado, los macrófagos deficientes en *Trex1* presentaron una disminución en la capacidad de fagocitar cuerpos apoptóticos, y un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias, los niveles de CD68 y la presentación antigénica (Pereira-Lopes et al., 2013). Estos datos sugieren que las alteraciones producidas en el macrófago, pueden ser la base de la autoinmunidad en el AGS. En resumen, nuestro grupo ha demostrado que el déficit en los mecanismos de reparación del ADN en los macrófagos puede alterar sus funciones y consecuentemente los procesos donde éstos intervienen (Figura 48).

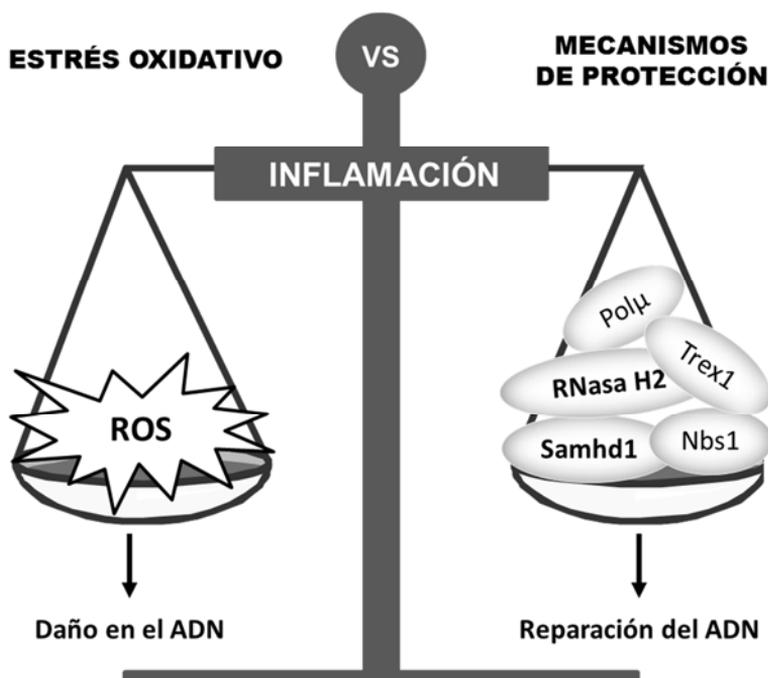


Figura 48. Balance de la activación proinflamatoria en los macrófagos. Los macrófagos son los mayores productores de las ROS durante la fase proinflamatoria. Están directamente expuestos a las roturas del ADN causadas por éstas. No obstante, mediante la inducción de mecanismos para reparar el ADN dañado, son capaces de sobrevivir y llevar a cabo los procesos de reparación y cicatrización tisular.

Se han descrito mutaciones en los genes *Trex1*, *Samhd1* y *RNasa H2* (Subunidades A, B y C) que causan el AGS. Estas mutaciones resultan en el

déficit funcional de Trex1, Samhd1 y del complejo RNasa H2, proteínas que tienen en común su participación en el procesamiento de los ácidos nucleicos. Por lo tanto, la ausencia de sus actividades enzimáticas resulta en la acumulación de éstos en el citosol induciendo una respuesta antivírica anti-ADN caracterizada por la producción de IFN de tipo I (Coffin et al., 2011; Crow et al., 2006a, 2015; Jackson and Bartek, 2009; Rice et al., 2009; Rigby et al., 2008). En nuestro grupo se identificó a Trex1 como un regulador negativo de la actividad proinflamatoria en los macrófagos (Pereira-Lopes et al., 2013). Además, también se observó la colocalización de Trex1 y Samhd1 en los macrófagos activados con estímulos proinflamatorios (datos no publicados). Así pues, Samhd1 también podría estar implicada en los mecanismos de reparación del ADN y ejercer un papel similar al de Trex1 en los macrófagos.

Los macrófagos con actividad proinflamatoria producen grandes cantidades de ROS que pueden dañar su ADN. En este estudio hemos visto que Samhd1 y el complejo RNasa H2 forman parte de los mecanismos de reparación del ADN que aseguran la supervivencia de los macrófagos durante la inflamación.

Dada sus funciones, Samhd1 y el complejo RNasa H2 se expresan ubicuamente, aunque en el caso de Samhd1 se han observado diferencias entre tejidos y tipos celulares (Schmidt et al., 2015). En este estudio se detectó la expresión de los genes *Samhd1*, *Rnasah2a*, *Rnasah2b*, y *Rnasah2c* en distintos tejidos murinos. En especial en aquellos con gran infiltración de células inmunitarias, como son el bazo y la cavidad peritoneal. Además, también se detectó un aumento en la expresión de los genes que codifican para el complejo RNasa H2 en el timo. Así pues, Samhd1 y el complejo RNasa H2 tienen un papel importante en el sistema inmunitario. Además, el aumento en la expresión de los genes que codifican para estas proteínas se detectó específicamente en aquellos tejidos donde hay una mayor infiltración de macrófagos. Esta fue la primera evidencia que relacionó a estas proteínas dentro de la biología del macrófago.

Durante todo el proyecto se utilizaron como modelo celular los macrófagos derivados de médula ósea (BMDM). Éstos conforman una población homogénea

que permite el estudio de las funciones de los macrófagos fácilmente *in vitro* (Celada et al., 1984; Weischenfeldt and Porse, 2008). Los macrófagos son células capaces de realizar un elevado número de funciones como por ejemplo la fagocitosis, la presentación de antígeno o la producción de mediadores durante la inflamación (Epelman et al., 2014). Son células con una gran plasticidad fenotípica capaces de generar una respuesta adecuada en función del microambiente en el que se encuentre. Especialmente en relación con las citocinas y los factores de crecimiento (Akagawa, 2002b; Akagawa et al., 2006b; Comalada et al.; Shapouri-Moghaddam et al., 2018b).

En este trabajo se activaron los macrófagos mediante el uso de los estímulos proinflamatorios IFN- γ o LPS, y del estímulo antiinflamatorio IL-4. Se determinó que la expresión de *Samhd1* y la producción de la proteína se inducían en los macrófagos activados con los estímulos proinflamatorios IFN- γ y LPS. Por lo tanto, las funciones de *Samhd1* son requeridas en los macrófagos proinflamatorios. Sin embargo, no se detectó un incremento en la expresión de *Samhd1* en los macrófagos activados con el estímulo antiinflamatorio IL-4. Desde los trabajos de Modolell Munder se ha establecido que las citocinas IL-4 y IFN- γ tienen efectos antagonistas en la polarización de los macrófagos, la cual está mediada por STAT6 y STAT1 respectivamente (Munder et al., 1998). Hoy en día sabemos que otras citocinas también pueden mediar la polaridad de los macrófagos y que no existen únicamente dos poblaciones. Así pues, no podemos descartar totalmente la implicación de *Samhd1* en su activación antiinflamatoria, ya que la activación de los macrófagos es mucho más compleja (Murray et al., 2014; Shapouri-Moghaddam et al., 2018a; Sica and Mantovani, 2012). Asimismo, tampoco se detectó la expresión de *Samhd1* en los macrófagos tratados con los estímulos proliferativos M-CSF o GM-CSF como era de esperar, ya que *Samhd1* no se expresa en células cíclicas (Ji et al., 2014). Estos hallazgos confirmaron que *Samhd1* tiene un papel durante la respuesta inflamatoria en los macrófagos.

Respecto al complejo RNasa H2, no se detectaron diferencias en la expresión de los genes *Rnasah2a*, *Rnasah2b*, y *Rnasah2c* en ninguno de los casos. No

obstante, dada su función este complejo es indispensable para la vida, por lo que no se debe descartar su implicación en las funciones de los macrófagos.

Para estudiar más en detalle el efecto de *Samhd1* en los macrófagos se utilizó el modelo de ratón para el estudio del AGS *knock-out Samhd1* (*Samhd1^{-/-}*) (Rehwinkel et al., 2013). Los ratones *Samhd1^{-/-}* eran viables y no desarrollaban ninguna patología, pese a que tenían incrementados los niveles de dNTPs intracelulares. Sin embargo, en el bazo y en los macrófagos mostraron un incremento en la expresión ISGs de manera espontánea, aunque no detectaron IFN-I en suero (Rehwinkel et al., 2013). Los ratones *knock-in Rnasa h2c* con la mutación R69W (*Rnasa h2c^{R69W/R69W}*) (Datos no publicados) que mimetizan la alteración del aminoácido R69W (cambio de C a T) descrita en AGS (Crow et al., 2006b) se utilizaron para determinar la función del complejo RNasa H2 en los macrófagos. Estos ratones eran viables pese a que tenían la actividad enzimática del complejo reducida al 35% (Chon et al., 2009). De hecho, la abolición total de su actividad es letal (Hiller et al., 2012; Mackenzie et al., 2016; Pokatayev et al., 2016).

Los síntomas del AGS suelen aparecer durante el primer año de vida, por lo que se están investigando diferentes biomarcadores que permitan detectar fácilmente la predisposición del individuo a padecer esta enfermedad. Actualmente el biomarcador más homogéneo y sensible es el estudio de la expresión de distintos genes estimulados por interferón (ISGs) (Rice et al., 2013b). En este estudio detectamos la sobreexpresión de una serie de ISGs en el cerebro y en el corazón de los ratones *Samhd1^{-/-}* y *Rnasa h2c^{R69W/R69W}*. En ratones con el gen *Rnasa h2b* alterado también se detectó este mismo patrón (Mackenzie et al., 2016). Por lo tanto, las actividades funcionales de estas proteínas podrían tener un efecto en la homeostasis del sistema inmunitario donde el macrófago tiene un papel clave en la regulación de la respuesta inflamatoria. En los macrófagos deficientes en *Samhd1* no conseguimos detectar la sobreexpresión espontánea de ISGs como se había visto en estudios anteriores (Rehwinkel et al., 2013), ni tampoco en los macrófagos senescentes (Datos no mostrados). No obstante, en los macrófagos activados con estímulos proinflamatorios pudimos detectar un aumento en la expresión de varios ISGs

debido a la ausencia de *Samhd1* y el déficit del complejo RNasa H2. Estas observaciones sugirieron que en las enfermedades asociadas a mutaciones en los genes *Samhd1* y *Rnasah2c* el macrófago puede tener un papel clave en su patogenia. Pese a que los modelos *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} no mimetizan completamente el fenotipo característico de los pacientes con AGS, fueron una herramienta útil para estudiar el efecto de las alteraciones genéticas en *Samhd1* y *Rnasah2c* en las funciones de los macrófagos y en las enfermedades autoinmunes.

En nuestro grupo se ha observado que el déficit funcional de las proteínas que participan de algún modo en el metabolismo de los ácidos nucleicos provocan alteraciones en las funciones de los macrófagos (Pereira-Lopes et al., 2013, 2015b). El factor M-CSF es indispensable en la diferenciación y en las funciones de la mayoría de las células mononucleares fagocíticas, incluyendo los macrófagos (Hamilton, 1997). En estas células obtenidas a partir de la médula ósea de los ratones *Samhd1*^{-/-} y *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} no se encontraron diferencias en la diferenciación y en la proliferación dependiente del factor M-CSF. Por lo cual, la carencia de estas nucleasas no tiene un efecto en la respuesta de los macrófagos al M-CSF, factor indispensable en la proliferación y en el reclutamiento de los macrófagos al foco de la inflamación (Chitu and Stanley, 2006).

Durante la respuesta inflamatoria los macrófagos generan un ambiente altamente oxidativo que puede afectar a la supervivencia de las células (Arango Duque and Descoteaux, 2014; Mittal et al., 2013; Nakad and Schumacher, 2016; Pálmai-Pallag and Bachrati, 2014), y del propio macrófago si no dispone de los mecanismos de protección adecuados (Pereira-Lopes et al., 2015b). En presencia de estímulos proinflamatorios los macrófagos no proliferan al inducirse la parada en el ciclo celular en el interfase G1/S (Seiler et al., 2007; Xaus et al., 1999a). El punto de control G1/S evita que la célula con daño en su ADN pueda entrar en la fase S (Barnum and O'Connell, 2014). En presencia del factor proliferativo M-CSF, tras el bloqueo inducido por estímulos proinflamatorios, las proteínas *Samhd1* y RNasa H2 no intervienen en la progresión en el ciclo celular de los macrófagos. Además, tampoco afectan a la viabilidad de estas células.

Por lo cual la capacidad de recuperación y la resistencia de los macrófagos frente a estímulos proinflamatorios no está regulada por Samhd1 o el complejo RNasa H2.

Los macrófagos son células que intervienen activamente en el desarrollo y en la resolución de la respuesta inflamatoria, por lo que su actividad está estrictamente regulada a nivel transcripcional (Valledor et al., 2010). En nuestro grupo se identificó a Trex1 como un regulador negativo de la actividad proinflamatoria de los macrófagos (Pereira-Lopes et al., 2013). Igualmente, el déficit de Samhd1 o RNasa H2 podría exacerbar la actividad proinflamatoria de los macrófagos. Sin embargo, Samhd1 y RNasa H2 no influyeron en la activación de los macrófagos hacia un perfil pro o antiinflamatorio.

En la respuesta inflamatoria los macrófagos producen grandes cantidades de ROS capaces de dañar distintos componentes celulares, como por ejemplo el ADN (Nathan and Cunningham-Bussel, 2013). Los monocitos, progenitores de los macrófagos, son muy sensibles a las ROS debido a la falta de mecanismos de reparación de las roturas del ADN (Ponath and Kaina, 2017b). En cambio los macrófagos son células muy resistentes ya que disponen de los mecanismos necesarios para la reparación del ADN dañado (Mittal et al., 2013). No obstante, existen alteraciones genéticas que pueden afectar a estos mecanismos y exponerlos a las ROS que éstos producen (Pereira-Lopes et al., 2015b). El déficit de Samhd1 y RNasa H2 en los macrófagos resultó en el aumento de la expresión del gen $p21^{waf-1}$, indicando el bloqueo en el avance el ciclo celular en la interfase G1/S y protegiendo de la apoptosis (Karimian et al., 2016b; Xaus et al., 2001). El inhibidor de CDK $p21^{waf-1}$ es diana de p53, proteína efectora en las vías de señalización que reconocen el daño en el ADN (Blackford and Jackson, 2017). Este fue el primer indicio que nos permitió situar a Samhd1 y al complejo RNasa H2 en los mecanismos de reparación del ADN en los macrófagos. Se observó que los macrófagos deficientes en Samhd1 o RNasa H2 activados con estímulos proinflamatorios acumulaban más roturas en su ADN. Además, se señaló a las especies reactivas de oxígeno (ROS) como la causa de estas roturas. La alteración en el metabolismo de las ROS por parte de los macrófagos también podría causar daño en el ADN de los macrófagos. Sin embargo, no se

detectaron cambios ni en la producción de las ROS ni en los mecanismos de defensa contra éstas. Por lo tanto, *Samhd1* y *RNasa H2* no participan en el metabolismo de los ROS, pero podrían intervenir de alguna manera en los mecanismos de reparación del ADN.

El balance entre el daño en el ADN inducido por las ROS y los mecanismos de reparación del ADN determina la presencia o la ausencia de lesiones en las células y en los tejidos (Pálmai-Pallag and Bachrati, 2014). Por lo tanto, las alteraciones en los genes *Samhd1* y *RNasa h2c* inclinan la balanza a favor del daño en el ADN. De hecho, SAMHD1 promueve la recombinación homóloga en las roturas causadas por agentes que provocan roturas de doble cadena (DSBs) (Cabello-Lobato et al., 2017; Daddacha et al., 2017). También se ha visto que el complejo *RNasa H2* previene el daño en el ADN a través de la eliminación de los ribonucleosidos monofosfato (rNMPs) que se acumulan en el ADN (Pizzi et al., 2015). En resumen, estas proteínas podrían formar parte de los mecanismos de reparación del ADN dañado en los macrófagos, debido al incremento en las ROS durante la respuesta inflamatoria.

Existen distintas mutaciones en los genes *Samhd1* y *RNasa H2* que dan origen al AGS (Crow et al., 2015). Éste afecta severamente al cerebro, causando espasticidad, distonía, convulsiones, ceguera, microcefalea y retraso (Crow et al., 2015). No obstante, los síntomas suelen aparecer durante el primer año de vida, lo cual sugiere la existencia de un detonante exógeno que induzca la enfermedad. La microglía constituye el 5-10% de las células totales en el cerebro y conforma la única población de macrófagos en el parénquima del sistema nervioso central (SNC). A lo largo del SNC podemos encontrar otras poblaciones de macrófagos situadas de manera estratégica, mientras que en la red vascular residen las células mieloides circulantes (Ginhoux et al., 2013). Además, en el transcurso de las enfermedades donde se rompe la barrera hematoencefálica (BHE) los monocitos proinflamatorios pueden migrar al parénquima cerebral y diferenciarse a macrófagos para acrecentar o aliviar la progresión de la enfermedad (Amici et al., 2017; Li and Barres, 2017). En nuestro grupo utilizamos el modelo de EAE para el estudio de *Samhd1* y del complejo *RNasa H2* en las enfermedades autoinmunes que afectan al SNC.

Este modelo nos permitió mimetizar parcialmente el fenotipo encontrado en pacientes con AGS. Los ratones *Samhd1*^{-/-} presentaron una progresión más rápida y severa de la enfermedad. Sin embargo, en los ratones *Rnasa h2c*^{R69W/R69W} el déficit en la actividad RNasa H2 no fue suficiente para aumentar la severidad en la progresión de la EAE, tal y como se ha visto en el *knock-out* condicional *Rnasa h2b* en astrocitos y neuronas (Bartsch et al., 2018).

En definitiva, estas observaciones sugieren que tanto *Samhd1* como el complejo RNasa H2, junto a otras proteínas como son la exonucleasa *Trex1* o la ADN Polimerasa- μ , conforman los mecanismos de protección de los macrófagos durante la respuesta inflamatoria. Éstos previenen el daño en el ADN causado por las grandes cantidades de ROS que estas células producen. Por lo tanto, en el AGS estas proteínas podrían participar en la eliminación de los fragmentos de ADN que inducen la respuesta mediada por IFN de tipo I, y que son la base para la inducción de la autoinmunidad (Figura 49).

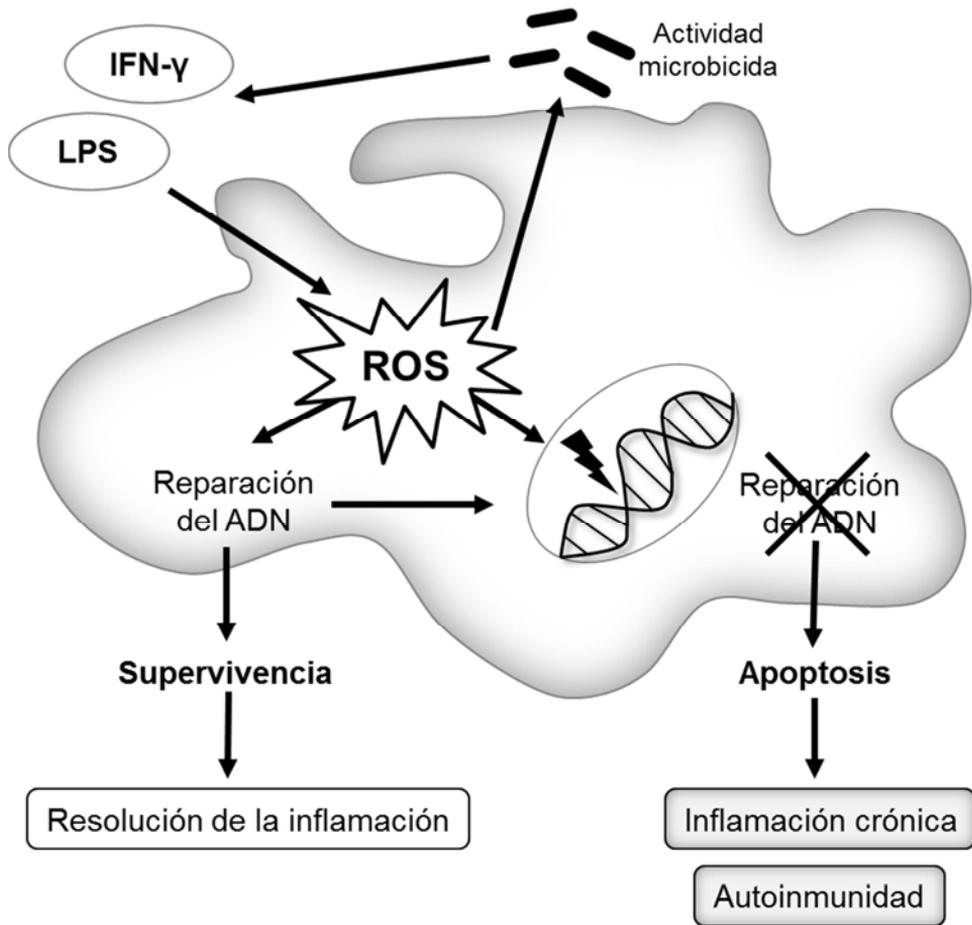


Figura 49. Mecanismo de supervivencia de los macrófagos en el foco inflamatorio. Durante la fase proinflamatoria (destructiva) se producen grandes cantidades de ROS, útiles en la destrucción de los agentes infecciosos. Estas ROS también pueden dañar el ADN de los macrófagos. Para protegerse se inducen una serie de proteínas que participan en la reparación del ADN, como son Samhd1 y el complejo RNasa H2. En su ausencia, los macrófagos no podrían sobrevivir y participar en la resolución de la inflamación, induciendo la inflamación crónica y la autoinmunidad.

Conclusiones

Los experimentos realizados demuestran que *Samhd1* y el complejo RNasa H2 son sistemas de protección de los macrófagos, cuando se activan de forma proinflamatoria y se producen grandes cantidades de ROS que dañan el ADN. Además, en los experimentos *in vivo* de inducción de la EAE hemos visto que la carencia de *Samhd1* agrava la enfermedad.

1. Los estímulos proinflamatorios en los macrófagos inducen la expresión de *Samhd1* mientras que el complejo RNasa H2 es constitutivo.
2. La ausencia de *Samhd1* y el déficit funcional de RNasa H2 inducen la expresión de ISGs en el corazón y en el cerebro, así como en los macrófagos activados con estímulos proinflamatorios.
3. Las actividades enzimáticas de *Samhd1* y RNasa H2 no afectan en la diferenciación, proliferación y la activación de los macrófagos.
4. *Samhd1* y RNasa H2 protegen al macrófago del daño en el ADN causado por las ROS que éstos producen.
5. La falta de *Samhd1* aumenta la severidad de la respuesta autoinmunitaria en el modelo *in vivo* EAE.

Bibliografía

- Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* *15*, 2177–2196.
- Ahn, J., Ruiz, P., and Barber, G.N. (2014). Intrinsic Self-DNA Triggers Inflammatory Disease Dependent on STING. *J. Immunol.* *193*, 4634–4642.
- Aicardi, J., and Goutières, F. (1984). A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis. *Ann. Neurol.* *15*, 49–54.
- Akagawa, K.S. (2002a). Functional Heterogeneity of Colony-Stimulating Factor-Induced Human Nonocyte-Derived Macrophages. *Int. J. Hematol.* *76*, 27–34.
- Akagawa, K.S. (2002b). Functional Heterogeneity of Colony-Stimulating Factor-Induced Human Nonocyte-Derived Macrophages. *Int. J. Hematol.* *76*, 27–34.
- Akagawa, K.S., Komuro, I., Kanazawa, H., Yamazaki, T., Mochida, K., and Kishi, F. (2006a). Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology* *11*, S32–S36.
- Akagawa, K.S., Komuro, I., Kanazawa, H., Yamazaki, T., Mochida, K., and Kishi, F. (2006b). Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology* *11*.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499–511.
- Amici, S.A., Dong, J., and Guerau-de-Arellano, M. (2017). Molecular Mechanisms Modulating the Phenotype of Macrophages and Microglia. *Front. Immunol.* *8*.
- Ank, N., West, H., Bartholdy, C., Eriksson, K., Thomsen, A.R., and Paludan, S.R. (2006). Lambda Interferon (IFN- λ), a Type III IFN, Is Induced by Viruses and IFNs and Displays Potent Antiviral Activity against Select Virus Infections In Vivo. *J. Virol.* *80*, 4501–4509.
- Arango Duque, G., and Descoteaux, A. (2014). Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* *5*.

- Baleriola, J., Álvarez-Lindo, N., de la Villa, P., Bernad, A., Blanco, L., Suárez, T., and de la Rosa, E.J. (2016). Increased neuronal death and disturbed axonal growth in the Pol μ -deficient mouse embryonic retina. *Sci. Rep.* 6.
- Ballana, E., and Esté, J.A. (2015). SAMHD1: At the Crossroads of Cell Proliferation, Immune Responses, and Virus Restriction. *Trends Microbiol.* 23, 680–692.
- Barnum, K.J., and O'Connell, M.J. (2014). Cell Cycle Regulation by Checkpoints. In *Cell Cycle Control*, E. Noguchi, and M.C. Gadaleta, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 29–40.
- Bartsch, K., Damme, M., Regen, T., Becker, L., Garrett, L., Höltter, S.M., Knittler, K., Borowski, C., Waisman, A., Glatzel, M., et al. (2018). RNase H2 Loss in Murine Astrocytes Results in Cellular Defects Reminiscent of Nucleic Acid-Mediated Autoinflammation. *Front. Immunol.* 9.
- Beck-Engeser, G.B., Eilat, D., and Wabl, M. (2011). An autoimmune disease prevented by anti-retroviral drugs. *Retrovirology* 8, 91.
- Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* 66, 801–817.
- Borden, E.C., Sen, G.C., Uze, G., Silverman, R.H., Ransohoff, R.M., Foster, G.R., and Stark, G.R. (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 975–990.
- Burgess, A.W., and Metcalf, D. (1980). The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 56, 947–958.
- Buzovetsky, O., Tang, C., Knecht, K.M., Antonucci, J.M., Wu, L., Ji, X., and Xiong, Y. (2018). The SAM domain of mouse SAMHD1 is critical for its activation and regulation. *Nat. Commun.* 9.
- Cabello-Lobato, M.J., Wang, S., and Schmidt, C.K. (2017). SAMHD1 Sheds Moonlight on DNA Double-Strand Break Repair. *Trends Genet.* 33, 895–897.
- Celada, A., and Nathan, C. (1994). Macrophage activation revisited. *Immunol. Today* 15, 100–102.

Celada, A., Gray, P.W., Rinderknecht, E., and Schreiber, R.D. (1984). Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J. Exp. Med.* 160, 55–74.

Celada, A., Borràs, F.E., Soler, C., Lloberas, J., Klemsz, M., van Beveren, C., McKercher, S., and Maki, R.A. (1996). The transcription factor PU.1 is involved in macrophage proliferation. *J. Exp. Med.* 184, 61–69.

Cerritelli, S.M., and Crouch, R.J. (2009). Ribonuclease H: the enzymes in Eukaryotes. *FEBS J.* 276, 1494–1505.

Chitu, V., and Stanley, E.R. (2006). Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 39–48.

Chon, H., Vassilev, A., DePamphilis, M.L., Zhao, Y., Zhang, J., Burgers, P.M., Crouch, R.J., and Cerritelli, S.M. (2009). Contributions of the two accessory subunits, RNASEH2B and RNASEH2C, to the activity and properties of the human RNase H2 complex. *Nucleic Acids Res.* 37, 96–110.

Chon, H., Sparks, J.L., Rychlik, M., Nowotny, M., Burgers, P.M., Crouch, R.J., and Cerritelli, S.M. (2013). RNase H2 roles in genome integrity revealed by unlinking its activities. *Nucleic Acids Res.* 41, 3130–3143.

Clifford, R., Louis, T., Robbe, P., Ackroyd, S., Burns, A., Timbs, A.T., Colopy, G.W., Dreau, H., Sigaux, F., Judde, J.G., et al. (2014). SAMHD1 is mutated recurrently in chronic lymphocytic leukemia and is involved in response to DNA damage. *Blood* 123, 1021–1031.

Coffin, S.R., Hollis, T., and Perrino, F.W. (2011). Functional Consequences of the RNase H2A Subunit Mutations That Cause Aicardi-Goutières Syndrome. *J. Biol. Chem.* 286, 16984–16991.

Colonna, M. (2015). DNA damage response impacts macrophage functions. *Blood* 126, 2440–2442.

Comalada, M., Lloberas, J., and Celada, A. (2012). MKP-1: A critical phosphatase in the biology of macrophages controlling the switch between proliferation and activation. *Eur. J. Immunol.* 42, 1938–1948.

Comalada, M., Valledor, A.F., Sanchez-Tilló, E., Umbert, I., Xaus, J., and Celada, A. Macrophage colony-stimulating factor-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.

Cooper, M.D., and Alder, M.N. (2006). The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell* 124, 815–822.

Covarrubias, A., Byles, V., and Horng, T. (2013). ROS sets the stage for macrophage differentiation. *Cell Res.* 23, 984–985.

Crow, Y.J., Leitch, A., Hayward, B.E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., et al. (2006a). Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat. Genet.* 38, 910–916.

Crow, Y.J., Leitch, A., Hayward, B.E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., et al. (2006b). Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat. Genet.* 38, 910–916.

Crow, Y.J., Vanderver, A., Orcesi, S., Kuijpers, T.W., and Rice, G.I. (2014). Therapies in Aicardi-Goutières syndrome: Therapies in AGS. *Clin. Exp. Immunol.* 175, 1–8.

Crow, Y.J., Chase, D.S., Lowenstein Schmidt, J., Szykiewicz, M., Forte, G.M.A., Gornall, H.L., Ojageer, A., Anderson, B., Pizzino, A., Helman, G., et al. (2015). Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in *TREX1*, *RNASEH2A*, *RNASEH2B*, *RNASEH2C*, *SAMHD1*, *ADAR*, and *IFIH1*. *Am. J. Med. Genet. A.* 167, 296–312.

Cuadrado, E., Vanderver, A., Brown, K.J., Sandza, A., Takanohashi, A., Jansen, M.H., Anink, J., Herron, B., Orcesi, S., Olivieri, I., et al. (2015). Aicardi-Goutières syndrome harbours abundant systemic and brain-reactive autoantibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 1931–1939.

Daddacha, W., Koyen, A.E., Bastien, A.J., Head, P.E., Dhere, V.R., Nabeta, G.N., Connolly, E.C., Werner, E., Madden, M.Z., Daly, M.B., et al. (2017). SAMHD1 Promotes DNA End Resection to Facilitate DNA Repair by Homologous Recombination. *Cell Rep.* 20, 1921–1935.

Dai, X.-M., Zong, X.-H., Sylvestre, V., and Stanley, E.R. (2004). Incomplete restoration of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) function in CSF-1-deficient Csf1op/Csf1op mice by transgenic expression of cell surface CSF-1. *Blood* 103, 1114–1123.

Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 986–995.

Desmet, C.J., and Ishii, K.J. (2012). Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 479–491.

Epelman, S., Lavine, K.J., and Randolph, G.J. (2014). Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* 41, 21–35.

Eruslanov, E., and Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. In *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*, D. Armstrong, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 57–72.

Gall, A., Treuting, P., Elkon, K.B., Loo, Y.-M., Gale, M., Barber, G.N., and Stetson, D.B. (2012). Autoimmunity Initiates in Nonhematopoietic Cells and Progresses via Lymphocytes in an Interferon-Dependent Autoimmune Disease. *Immunity* 36, 120–131.

Georgoulis, A., Vorgias, C., Chrousos, G., and Rogakou, E. (2017). Genome Instability and γ H2AX. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1979.

Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., and Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* 7.

Gozalbo-Lopez, B., Andrade, P., Terrados, G., de Andres, B., Serrano, N., Cortegano, I., Palacios, B., Bernad, A., Blanco, L., Marcos, M.A.R., et al. (2009).

A Role for DNA Polymerase in the Emerging DJH Rearrangements of the Postgastrulation Mouse Embryo. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 1266–1275.

Guilliams, M., and Scott, C.L. (2017). Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 451.

Hamilton, J.A. (1997). CSF-1 signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* *62*, 145–155.

Hiller, B., Achleitner, M., Glage, S., Naumann, R., Behrendt, R., and Roers, A. (2012). Mammalian RNase H2 removes ribonucleotides from DNA to maintain genome integrity. *J. Exp. Med.* *209*, 1419–1426.

Hohaus, S., Petrovick, M.S., Voso, M.T., Sun, Z., Zhang, D.E., and Tenen, D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 5830–5845.

Hollenbaugh, J.A., Tao, S., Lenzi, G.M., Ryu, S., Kim, D.-H., Diaz-Griffero, F., Schinazi, R.F., and Kim, B. (2014a). dNTP pool modulation dynamics by SAMHD1 protein in monocyte-derived macrophages. *Retrovirology* *11*, 1.

Hollenbaugh, J.A., Tao, S., Lenzi, G.M., Ryu, S., Kim, D.-H., Diaz-Griffero, F., Schinazi, R.F., and Kim, B. (2014b). dNTP pool modulation dynamics by SAMHD1 protein in monocyte-derived macrophages. *Retrovirology* *11*, 63.

Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 36–49.

Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* *461*, 1071–1078.

Ji, X., Tang, C., Zhao, Q., Wang, W., and Xiong, Y. (2014). Structural basis of cellular dNTP regulation by SAMHD1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E4305–E4314.

Junt, T., and Barchet, W. (2015). Translating nucleic acid-sensing pathways into therapies. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 529–544.

Karimian, A., Ahmadi, Y., and Yousefi, B. (2016a). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair* *42*, 63–71.

Karimian, A., Ahmadi, Y., and Yousefi, B. (2016b). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair* 42, 63–71.

Lee-Kirsch, M.A. (2017). The Type I Interferonopathies. *Annu. Rev. Med.* 68, 297–315.

Kretschmer, S., Wolf, C., König, N., Staroske, W., Guck, J., Häusler, M., Luksch, H., Nguyen, L.A., Kim, B., Alexopoulou, D., et al. (2015). SAMHD1 prevents autoimmunity by maintaining genome stability. *Ann. Rheum. Dis.* 74, e17–e17.

Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R., and Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358, 417–421.

Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.* 13, 223–228.

Larionov, A., Krause, A., and Miller, W. (2005). A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* 6, 62.

Laskin, D.L., Sunil, V.R., Gardner, C.R., and Laskin, J.D. (2011). Macrophages and Tissue Injury: Agents of Defense or Destruction? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 267–288.

Lavin, M.F. (2008). Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 759–769.

Lawrence, T., Willoughby, D.A., and Gilroy, D.W. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 787–795.

Li, Q., and Barres, B.A. (2017). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 225–242.

Lim, S., and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140, 3079–3093.

- Lloberas, J., Valverde-Estrella, L., Tur, J., Vico, T., and Celada, A. (2016). Mitogen-Activated Protein Kinases and Mitogen Kinase Phosphatase 1: A Critical Interplay in Macrophage Biology. *Front. Mol. Biosci.* 3.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151.
- Mackenzie, K.J., Carroll, P., Lettice, L., Tarnauskaitė, Ž., Reddy, K., Dix, F., Revuelta, A., Abbondati, E., Rigby, R.E., Rabe, B., et al. (2016). Ribonuclease H2 mutations induce a cGAS/STING-dependent innate immune response. *EMBO J.* 35, 831–844.
- Maelfait, J., Bridgeman, A., Benlahrech, A., Cursi, C., and Rehwinkel, J. (2016). Restriction by SAMHD1 Limits cGAS/STING-Dependent Innate and Adaptive Immune Responses to HIV-1. *Cell Rep.* 16, 1492–1501.
- Mansilla, M.J., Sellès-Moreno, C., Fàbregas-Puig, S., Amoedo, J., Navarro-Barriuso, J., Teniente-Serra, A., Grau-López, L., Ramo-Tello, C., and Martínez-Cáceres, E.M. (2015). Beneficial Effect of Tolerogenic Dendritic Cells Pulsed with MOG Autoantigen in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *CNS Neurosci. Ther.* 21, 222–230.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549–555.
- Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A., and Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling: Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* 229, 176–185.
- Mauney, C.H., and Hollis, T. (2018). SAMHD1: Recurring roles in cell cycle, viral restriction, cancer, and innate immunity. *Autoimmunity* 51, 96–110.
- McCubrey, J.A., May, W.S., Duronio, V., and Mufson, A. (2000). Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia* 14, 9–21.

Mills, K.H.G. (2011). TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 807–822.

Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., and Malik, A.B. (2013). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1126–1167.

Mogensen, T.H. (2009). Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 240–273.

Morita, M., Stamp, G., Robins, P., Dulic, A., Rosewell, I., Hrivnak, G., Daly, G., Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2004a). Gene-Targeted Mice Lacking the Trex1 (DNase III) 3'→5' DNA Exonuclease Develop Inflammatory Myocarditis. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6719–6727.

Morita, M., Stamp, G., Robins, P., Dulic, A., Rosewell, I., Hrivnak, G., Daly, G., Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2004b). Gene-Targeted Mice Lacking the Trex1 (DNase III) 3'→5' DNA Exonuclease Develop Inflammatory Myocarditis. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6719–6727.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.

Munder, M., Eichmann, K., and Modolell, M. (1998). Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J. Immunol.* 160, 5347–5354.

Murphy, K., and Weaver, C. (2017). *Janeway's immunobiology.*

Murray, R.K., and Harper, H.A. (2013). *Harper. Bioquímica ilustrada (México, D.F.: McGraw Hill).*

Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41, 14–20.

- Nakad, R., and Schumacher, B. (2016). DNA Damage Response and Immune Defense: Links and Mechanisms. *Front. Genet.* 7.
- Nathan, C., and Cunningham-Bussel, A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 349–361.
- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A., and Goodship, J.A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia–telangiectasia and Rad3–related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat. Genet.* 33, 497–501.
- O'Neill, L.A., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors—redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 453.
- Pálmai-Pallag, T., and Bachrati, C.Z. (2014). Inflammation-induced DNA damage and damage-induced inflammation: a vicious cycle. *Microbes Infect.* 16, 822–832.
- Parkin, J., and Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet* 357, 1777–1789.
- Paull, T.T., and Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* 1, 969–979.
- Pauls, E., Ruiz, A., Riveira-Munoz, E., Permanyer, M., Badia, R., Clotet, B., Keppler, O.T., Ballana, E., and Este, J.A. (2014). p21 regulates the HIV-1 restriction factor SAMHD1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E1322–E1324.
- Pereira-Lopes, S., Celhar, T., Sans-Fons, G., Serra, M., Fairhurst, A.-M., Lloberas, J., and Celada, A. (2013). The Exonuclease Trex1 Restrains Macrophage Proinflammatory Activation. *J. Immunol.* 191, 6128–6135.
- Pereira-Lopes, S., Tur, J., Calatayud-Subias, J.A., Lloberas, J., Stracker, T.H., and Celada, A. (2015a). NBS1 is required for macrophage homeostasis and functional activity in mice. *Blood* 126, 2502–2510.

Pereira-Lopes, S., Tur, J., Calatayud-Subias, J.A., Lloberas, J., Stracker, T.H., and Celada, A. (2015b). NBS1 is required for macrophage homeostasis and functional activity in mice. *Blood* 126, 2502–2510.

Perrino, F.W., Harvey, S., Shaban, N.M., and Hollis, T. (2009). RNaseH2 mutants that cause Aicardi-Goutieres syndrome are active nucleases. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 87, 25–30.

Pixley, F.J., and Stanley, E.R. (2004). CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol.* 14, 628–638.

Pizzi, S., Sertic, S., Orcesi, S., Cereda, C., Bianchi, M., Jackson, A.P., Lazzaro, F., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2015). Reduction of hRNase H2 activity in Aicardi–Goutières syndrome cells leads to replication stress and genome instability. *Hum. Mol. Genet.* 24, 649–658.

Plowden, J., Renshaw-Hoelscher, M., Engleman, C., Katz, J., and Sambhara, S. (2004). Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 3, 161–167.

Pokatayev, V., Hasin, N., Chon, H., Cerritelli, S.M., Sakhuja, K., Ward, J.M., Morris, H.D., Yan, N., and Crouch, R.J. (2016). RNase H2 catalytic core Aicardi-Goutières syndrome–related mutant invokes cGAS–STING innate immune-sensing pathway in mice. *J. Exp. Med.* 213, 329–336.

Ponath, V., and Kaina, B. (2017a). Death of Monocytes through Oxidative Burst of Macrophages and Neutrophils: Killing in Trans. *PLoS One* 12, e0170347.

Ponath, V., and Kaina, B. (2017b). Death of Monocytes through Oxidative Burst of Macrophages and Neutrophils: Killing in Trans. *PLOS ONE* 12, e0170347.

Price, G.E., Gaszewska-Mastarlarz, A., and Moskophidis, D. (2000). The role of alpha/beta and gamma interferons in development of immunity to influenza A virus in mice. *J. Virol.* 74, 3996–4003.

Rabe, B. (2013). Aicardi–Goutières syndrome: clues from the RNase H2 knock-out mouse. *J. Mol. Med.* 91, 1235–1240.

Rankin, L.C., and Artis, D. (2018). Beyond Host Defense: Emerging Functions of the Immune System in Regulating Complex Tissue Physiology. *Cell* 173, 554–567.

Rehwinkel, J., Maelfait, J., Bridgeman, A., Rigby, R., Hayward, B., Liberatore, R.A., Bieniasz, P.D., Towers, G.J., Moita, L.F., Crow, Y.J., et al. (2013). SAMHD1-dependent retroviral control and escape in mice. *EMBO J.* 32, 2454–2462.

Reijns, M.A.M., Bubeck, D., Gibson, L.C.D., Graham, S.C., Baillie, G.S., Jones, E.Y., and Jackson, A.P. (2011). The Structure of the Human RNase H2 Complex Defines Key Interaction Interfaces Relevant to Enzyme Function and Human Disease. *J. Biol. Chem.* 286, 10530–10539.

Rice, G., Patrick, T., Parmar, R., Taylor, C.F., Aeby, A., Aicardi, J., Artuch, R., Montalto, S.A., Bacino, C.A., Barroso, B., et al. (2007). Clinical and Molecular Phenotype of Aicardi-Goutières Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 713–725.

Rice, G.I., Bond, J., Asipu, A., Brunette, R.L., Manfield, I.W., Carr, I.M., Fuller, J.C., Jackson, R.M., Lamb, T., Briggs, T.A., et al. (2009). Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. *Nat. Genet.* 41, 829–832.

Rice, G.I., Forte, G.M.A., Szykiewicz, M., Chase, D.S., Aeby, A., Abdel-Hamid, M.S., Ackroyd, S., Allcock, R., Bailey, K.M., Balottin, U., et al. (2013a). Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: a case-control study. *Lancet Neurol.* 12, 1159–1169.

Rice, G.I., Forte, G.M.A., Szykiewicz, M., Chase, D.S., Aeby, A., Abdel-Hamid, M.S., Ackroyd, S., Allcock, R., Bailey, K.M., Balottin, U., et al. (2013b). Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: a case-control study. *Lancet Neurol.* 12, 1159–1169.

Rigby, R.E., Leitch, A., and Jackson, A.P. (2008). Nucleic acid-mediated inflammatory diseases. *BioEssays* 30, 833–842.

Rodero, M.P., and Crow, Y.J. (2016). Type I interferon-mediated monogenic autoinflammation: The type I interferonopathies, a conceptual overview. *J. Exp. Med.* 213, 2527–2538.

Roesch, F., and Schwartz, O. (2013). The SAMHD1 knockout mouse model: in vivo veritas? *EMBO J.* 32, 2427–2429.

Schlee, M., and Hartmann, G. (2016). Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 566–580.

Schmidt, S., Schenkova, K., Adam, T., Erikson, E., Lehmann-Koch, J., Sertel, S., Verhasselt, B., Fackler, O.T., Lasitschka, F., and Keppler, O.T. (2015). SAMHD1's protein expression profile in humans. *J. Leukoc. Biol.* 98, 5–14.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189.

Seiler, J.A., Conti, C., Syed, A., Aladjem, M.I., and Pommier, Y. (2007). The Intra-S-Phase Checkpoint Affects both DNA Replication Initiation and Elongation: Single-Cell and -DNA Fiber Analyses. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5806–5818.

Serra, M. (2009). Papel de la exonucleasa TREX1 en el procesamiento del ADN monocatenario e implicaciones en la activación de los macrófagos. Universidad de Barcelona.

Serra, M., Forcales, S.-V., Pereira-Lopes, S., Lloberas, J., and Celada, A. (2011). Characterization of Trex1 induction by IFN- γ in murine macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 2299–2308.

Shaban, N.M., Harvey, S., Perrino, F.W., and Hollis, T. (2010). The Structure of the Mammalian RNase H2 Complex Provides Insight into RNA{middle dot}DNA Hybrid Processing to Prevent Immune Dysfunction. *J. Biol. Chem.* 285, 3617–3624.

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018a). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 233, 6425–6440.

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018b). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 233, 6425–6440.

Sharma, A., Singh, K., and Almasan, A. (2012). Histone H2AX Phosphorylation: A Marker for DNA Damage. In *DNA Repair Protocols*, (Humana Press, Totowa, NJ), pp. 613–626.

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795.

Smith, L.T., Hohaus, S., Gonzalez, D.A., Dziennis, S.E., and Tenen, D.G. (1996). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood* 88, 1234–1247.

Stanley, E.R., Berg, K.L., Einstein, D.B., Lee, P.S.W., Pixley, F.J., Wang, Y., and Yeung, Y.-G. (1997). Biology and action of colony-stimulating factor-1. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 4–10.

Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T., and Medzhitov, R. (2008). Trex1 Prevents Cell-Intrinsic Initiation of Autoimmunity. *Cell* 134, 587–598.

Sulli, G., Micco, R.D., and Fagagna, F. d'Adda di (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 709–720.

Takanohashi, A., Prust, M., Wang, J., Gordish-Dressman, H., Bloom, M., Rice, G.I., Schmidt, J.L., Crow, Y.J., Lebon, P., Kuijpers, T.W., et al. (2013). Elevation of proinflammatory cytokines in patients with Aicardi-Goutières syndrome. *Neurology* 80, 997–1002.

Tan, H.-Y., Wang, N., Li, S., Hong, M., Wang, X., and Feng, Y. (2016). The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016.

Tang, D., Kang, R., Coyne, C.B., Zeh, H.J., and Lotze, M.T. (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* 249, 158–175.

Udalova, I.A., Mantovani, A., and Feldmann, M. (2016). Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 472–485.

Valledor, A.F., Borràs, F.E., Cullèll-Young, M., and Celada, A. (1998). Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J. Leukoc. Biol.* 63, 405–417.

Valledor, A.F., Comalada, M., Xaus, J., and Celada, A. (2000). The Differential Time-course of Extracellular-regulated Kinase Activity Correlates with the Macrophage Response toward Proliferation or Activation. *J. Biol. Chem.* 275, 7403–7409.

Valledor, A.F., Sanchez-Tillo, E., Arpa, L., Park, J.M., Caelles, C., Lloberas, J., and Celada, A. (2008). Selective Roles of MAPKs during the Macrophage Response to IFN-. *J. Immunol.* 180, 4523–4529.

Valledor, A.F., Comalada, M., Santamaría-Babi, L.F., Lloberas, J., and Celada, A. (2010). Macrophage proinflammatory activation and deactivation: a question of balance. In *Advances in Immunology*, (Elsevier), pp. 1–20.

Vaure, Că., and Liu, Y. (2014). A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species. *Front. Immunol.* 5.

Wack, A., Terczyńska-Dyla, E., and Hartmann, R. (2015). Guarding the frontiers: the biology of type III interferons. *Nat. Immunol.* 16, 802–809.

Waters, R. (2006). Maintaining genome integrity. *EMBO Rep.* 7, 377–381.

Weischenfeldt, J., and Porse, B. (2008). Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2008, pdb.prot5080.

Xaus, J., Cardó, M., Valledor, A.F., Soler, C., Lloberas, J., and Celada, A. (1999a). Interferon γ Induces the Expression of p21waf-1 and Arrests

Macrophage Cell Cycle, Preventing Induction of Apoptosis. *Immunity* 11, 103–113.

Xaus, J., Mirabet, M., Lloberas, J., Soler, C., Lluís, C., Franco, R., and Celada, A. (1999b). IFN-gamma up-regulates the A2B adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 162, 3607–3614.

Xaus, J., Comalada, M., Valledor, A.F., Lloberas, J., López-Soriano, F., Argilés, J.M., Bogdan, C., and Celada, A. (2000). LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood* 95, 3823–3831.

Xaus, J., Comalada, M., Valledor, A.F., Cardó, M., Herrero, C., Soler, C., Lloberas, J., and Celada, A. (2001). Molecular Mechanisms Involved in Macrophage Survival, Proliferation, Activation or Apoptosis. *Immunobiology* 204, 543–550.

Yan, J., Hao, C., DeLucia, M., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Ahn, J., and Skowronski, J. (2015). CyclinA2-Cyclin-dependent Kinase Regulates SAMHD1 Protein Phosphohydrolase Domain. *J. Biol. Chem.* 290, 13279–13292.

Yang, Y.-G., Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2007). Trex1 Exonuclease Degrades ssDNA to Prevent Chronic Checkpoint Activation and Autoimmune Disease. *Cell* 131, 873–886.

Zhang, X., and Mosser, D. (2008). Macrophage activation by endogenous danger signals. *J. Pathol.* 214, 161–178.