

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Reprogramación farmacológica de macrófagos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Baltasar López Navarro

DIRIGIDA POR

Amaya Puig Kröger

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



TESIS DOCTORAL

**REPROGRAMACIÓN FARMACOLÓGICA
DE MACRÓFAGOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Baltasar López Navarro

DIRECTORA

Amaya Puig Kröger

A mi madre, Pilar

Llegó el ansiado momento, y aquí me encuentro, redactando los agradecimientos de la tesis que ha copado prácticamente todo mi tiempo desde que comencé hace casi 4 años. Como en todos los caminos, esta etapa ha estado llena de altibajos y muchas emociones que me han hecho aprender y crecer ante la adversidad. Gracias al apoyo que supone tener personas que te aprecian, te escuchan, te comprenden y te guían hacia el final del camino, es por lo que hoy este manuscrito existe. Por ello, me gustaría tener unas palabras con aquellas personas que han estado desde el principio de esta etapa, y que se merecen este reconocimiento tanto como yo.

En primer lugar, quiero agradecer a **Amaya**, mi directora, por abrirme las puertas de la ciencia y de su laboratorio. Durante toda la etapa predoctoral me has guiado hacia los objetivos, y con buen trabajo y la ayuda de todos los colaboradores, hemos conseguido las publicaciones de los artículos que aparecen en esta tesis. Estos logros pertenecen al grupo de investigación que con tanto esfuerzo has mantenido y que espero que siga creciendo.

A continuación, a mi equipo, el que ha estado siempre detrás de cada jornada de trabajo. A **Sara**, por guiarme en los primeros pasos; a **Israel**, por ser un pozo de sabiduría y el mejor compañero de equipo que podía pedir; a las hermanas Sánchez, **Alicia** y **Raquel**, porque sois tan madres de los JAKi como yo; a **Teresa**, por tu amabilidad y solidaridad, siempre dispuesta a echar una mano. El viaje a Viena y la experiencia en EULAR no habría sido igual sin ti. Y, especialmente, a **Mónica**, por ser el alma y el corazón de este equipo. Porque te has desvivido por cuidarme y por ayudarme todo lo que has podido y más. Y porque tu labor como técnico ha sido la más importante, sobre todo, por tu profesionalidad y tu humanidad.

Del Servicio de Reumatología del Gregorio Marañón quiero agradecer especialmente a **Tamara** y a **Isabel**, por procurarme esas valiosas muestras de pacientes. En este sentido, extendiendo este agradecimiento a **Isidoro** y a **Ana**, de la Princesa, por recibirme con los brazos abiertos.

Del Servicio de Inmunología del Gregorio Marañón, a todos los residentes y adjuntos que me han hecho sentir como en casa y me han dejado experimentar con ellos una pequeña parte de la vida como residente.

De manera especial quiero agradecer a mi equipo Marañón: **Héctor**, **Elena**, **Merchi**, **Cristina**, **Marta** e **Isma**. Porque me habéis brindado vuestra amistad, vuestro tiempo, y me habéis hecho ser muy feliz en esta etapa tan dura.

No puedo terminar este bloque sin agradecer al grupo con el que he compartido el 100% de las horas del laboratorio. A **Paloma** y a **Rafa**, por mostrarme que la ciencia también tiene un lado humano y personal, y por todas las enseñanzas que me habéis impartido. A **Alba** y a **Alicia**, porque sois unas cerebritos y he disfrutado de cada momento compartido con vosotras; a **Raquel** y a **Elena**, por animarme en cada paso de la tesis. Y a **Celia**, mi compañera de batallas, porque me has mostrado como enfrentarme a la adversidad y me has hecho crecer como persona. Ir de la mano contigo ha hecho que todo sea mucho más sencillo.

Fuera del hospital, quiero agradecer al Laboratorio de Células Mieloides del CIB, especialmente a **Ángel**, por dedicarme siempre palabras de ánimo y permitirme aprender tanto sobre macrófagos. Y a **Concha**, por mostrarte amable y respetuosa conmigo, y porque sin tus Jurkat, no existiría el paper de JAKi.

AGRADECIMIENTOS

También quiero agradecer a la familia que se elige. A mis amigos de Madrid: **Pablo P, Miriam, María, Víctor, Cris y Antonio**. Y a los de Murcia: **Lorena, Cristofer, Saray, Santi, Pablo L, Arturo, Jon, Riky, Carmen y Cynthia**. Soy lo que soy por vosotros, y por lo que hemos compartido durante tantos años. Miriam, sabes que esta tesis se ha llevado a cabo gracias en gran parte a ti, en todos los sentidos. Pablo L, no sé cómo voy a pagarte la portada tan maravillosa que has hecho para la tesis.

Una mención especial va dirigida a los Bretones, mis compañeros de piso, que siempre me han brindado palabras de consuelo y han vivido de primera mano todos los pasos de esta etapa. En especial a **Eli**, por cuidarme y dedicarme su atención cada vez que lo he necesitado.

Por último, quiero agradecer a mi familia, que es muy extensa para nombrarla, pero que saben que los quiero. En especial a mis hermanos, **César y Álex**, porque sois un referente para mí, y porque sacáis mi mejor versión. A mis padres, **Baltasar y Pilar**, porque sin vuestro esfuerzo y dedicación, no estaría aquí hoy. A **Odín**, el perro más bueno, inteligente y sociable que existe. Y a mis abuelos, los que están y los que ya no, por preocuparse siempre por mí, quererme y animarme en todos mis proyectos.

“No nos atrevemos a muchas cosas porque son difíciles, pero son difíciles porque no nos atrevemos a hacerlas”

Lucio Anneo Séneca

“Para llegar a ser sabio es preciso experimentar ciertas vivencias, a menudo peligrosas”

Friedrich Nietzsche

“Porque todos somos libres, como un pájaro con alas, pero si no tenemos un lugar al que ir, nunca llegaremos a ninguna parte”

Ai Higuchi

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 16 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 16 |
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS..... | 17 |
| RESUMEN | 25 |
| ABSTRACT | 29 |
| INTRODUCCIÓN | 33 |
| Sistema fagocítico mononuclear humano: monocitos y macrófagos | 35 |
| Monocitos | 35 |
| Macrófagos | 36 |
| El eje GM-CSF/GM-CSFR | 42 |
| El eje M-CSF/CSF1R..... | 43 |
| Los macrófagos asociados a tumor (TAMs)..... | 44 |
| Fármacos de tipo antifolato en el tratamiento del cáncer..... | 46 |
| Mecanismo de acción del metotrexato (MTX) y del pemetrexed (PMX)..... | 47 |
| Enfermedades inflamatorias inmunomediadas | 49 |
| Artritis Reumatoide (RA)..... | 49 |
| La señalización por las Janus quinasas (JAK) y las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT) | 54 |
| Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad | 58 |
| Metotrexato en RA | 59 |
| Inhibidores de las Janus quinasas (JAKi) | 61 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 65 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 69 |
| RESULTADOS | 73 |
| PUBLICACIONES | 77 |
| La inhibición de GSK3 β previene la reprogramación por dosis altas de metotrexato en macrófagos | 79 |
| La reprogramación de macrófagos por inhibidores de JAK depende de MAFB | 99 |
| DISCUSIÓN | 125 |
| CONCLUSIONES | 143 |
| BIBLIOGRAFÍA | 147 |
| ANEXOS | 171 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Factores que promueven la identidad de los TRMs | 37 |
| Figura 2. Sistema de diferenciación <i>in vitro</i> de monocitos a macrófagos humanos y marcadores característicos de cada perfil de polarización | 40 |
| Figura 3. Rutas de señalización iniciadas por GM-CSF y su regulación | 43 |
| Figura 4. Clasificación propuesta por <i>Ma et al.</i> , para las diferentes subpoblaciones de TAMs | 46 |
| Figura 5. Mecanismo de acción de los antifolatos MTX y PMX en macrófagos | 48 |
| Figura 6. Esquema simplificado de las poblaciones celulares presentes en la membrana sinovial sana y de pacientes con RA | 50 |
| Figura 7. Esquema representativo de los fenotipos de STMs identificados por <i>Alivernini et al.</i> , y clasificación de subpoblaciones propuesta | 52 |
| Figura 8. Familia de receptores de citoquinas de tipo I y de tipo II | 57 |
| Figura 9. Diagrama de flujo que representa el algoritmo actual (2022) de toma de decisiones para el control de los pacientes diagnosticados de RA según EULAR | 60 |
| Figura 10. Mecanismo de acción de los JAKi sobre la señalización del eje GM-CSF-GM-CSFR | 62 |
| Figura 11. Esquema de los resultados obtenido en la tesis | 128 |
| Figura 12. Comparación del perfil transcriptómico de los macrófagos tratados con JAKi (JAKi-GM-MØ) frente a las subpoblaciones de macrófagos residentes de tejido descritas por diferentes autores | 130 |
| Figura 13. Esquema de la posible relación entre la inhibición de JAK2 y la regulación de GSK3β | 133 |
| Figura 14. Esquema del efecto de los fármacos HD-MTX y JAKi sobre el perfil funcional de los macrófagos derivados de monocitos | 138 |
| Figura 15. Esquema del efecto de los JAKi sobre la frecuencia de las subpoblaciones de monocitos de sangre periférica | 140 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Clasificación, localización y tejido de las subpoblaciones de macrófagos propuestas por <i>Alivernini et al</i> | 53 |
| Tabla 2. Familia STAT: citoquinas y factores de crecimiento asociados, y sus funciones | 55 |
| Tabla 3. Características y funciones de los miembros de la familia JAK | 56 |
| Tabla 4. JAKi aprobados para su uso en RA y otras enfermedades inflamatorias. Tipo de inhibición y dianas farmacológicas (IC ₅₀) | 64 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Se refieren, en orden alfabético, todas las abreviaturas según sus siglas en inglés.

10-CHO-THF: 10-formil-THF

1C: metabolismo de las moléculas de un solo carbono

2',3'-cGAMP: 2',3'-monofosfato cíclico de GMP-AMP

5,10-CH₂-THF: 5,10-dimetil-THF

5-CH₃-THF: 5-metil-THF

ABC: proteína transportadora dependiente de ATP

ACP: fosfatasa ácida

ACPA: autoanticuerpo frente a proteínas citrulinadas

AICARFT/ATIC: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa

AKT: proteína quinasa B

AMP: adenosina monofosfato

AMPc: adenosina monofosfato cíclica

Angio-TAMs: TAMs proangiogénicos

anti-CarP: antiproteínas carbamoiladas

AP-1: proteína activadora 1

APO: apolipoproteína

ARG: arginasa

ATP: adenosina trifosfato

Bari-GM-MØ: GM-MØ tratado con baricitinib

bDMARD: DMARD biológico

BTK: tirosina quinasa de Bruton

bZIP: dominio básico de cremallera de leucina

c-di-AMP: monofosfato cíclico de diadenilo

C1: componente 1 del complemento

C/EBP: proteína de unión al potenciador/CCAAT

CAF: fibroblasto asociado a tumor

CBP: proteína de unión a CREB

CCL: ligando de quimioquina C-C

CCND2: ciclina D2

ÍNDICE DE CONTENIDO

- CCR:** receptor de quimioquina C-C
- CD:** conjunto/grupo de diferenciación
- CDK:** quinasa dependiente de ciclinas
- cGAS:** sintasa de GMP-AMP cíclico
- CISH:** proteína SH2 inducida por citoquinas
- CLCF1:** cardiotrofina similar a la citoquina 1
- CLR:** receptor de lectina tipo C
- CMKLR:** receptor similar a quimioquina
- CNTF:** factor neurotrófico ciliar
- CNTF-R:** receptor de CNTF
- COVID-19:** enfermedad por coronavirus 2019
- CREB:** proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc
- csDMARD:** DMARD convencional sintético
- CSF:** factor estimulante de colonias
- CT-1:** cardiotrofina 1
- CTLA4:** proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico
- CXCL:** ligando de quimioquina C-X-C
- CXCR:** receptor de CXCL
- DAMP:** patrón molecular asociado a daño
- DHF:** dihidrofolato
- DHFR:** dihidrofolato reductasa
- DMARD:** fármaco antirreumático modificador de la enfermedad
- DNA:** ácido desoxirribonucleico
- DNMT:** DNA metiltransferasa
- dTMP:** desoxitimidina monofosfato
- DUSP:** fosfatasa de especificidad dual
- ECSCR:** regulador de la apoptosis y quimiotaxis expresado en la superficie de la célula endotelial.
- EGF:** factor de crecimiento epidérmico
- EGLN:** factor inducible por hipoxia de la familia Egl-9
- EIMI:** enfermedades inflamatorias inmunomediadas
- EPO:** eritropoyetina

EPO-R: receptor de EPO

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

EULAR: *European Alliance of Associations for Rheumatology*

FABP: proteína de unión a ácido graso

FAICAR: 5-formamidoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido

Fc: fragmento constante

FCN: ficolina

FDA: *Food and Drug Administration*

FOLR: receptor de folato

FPGS: folilpoliglutamato sintasa

GARFT: glicinamida ribonucleótido formiltransferasa

G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos

G-CSFR: receptor del G-CSF

GGH: γ -glutamil hidrolasa

GH: hormona de crecimiento

GH-R: receptor de GH

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos

GM-CSFR: receptor de GM-CSF

GM-MØ: macrófago derivado de monocito estimulado *in vitro* con GM-CSF

GMP: guanosina monofosfato

GRB: proteína de unión al receptor del factor de crecimiento

GSK3: glucógeno sintasa quinasa 3

H3K27: histona 3 trimetilada en la lisina 27

HD-MTX: altas dosis de MTX

HDAC: histona desacetilasa

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos

HIF: factor inductor de hipoxia

HMGB: grupo de cajas de alta movilidad

HMOX: hemooxigenasa

HSCs: células madre hematopoyéticas

HSPC: célula madre precursora hematopoyética

HTR: receptor de la 5-hidroxitriptamina

ÍNDICE DE CONTENIDO

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

IC₅₀: concentración inhibitoria 50

ICAM: moléculas de adhesión intercelular

ID2: inhibidor de la unión al DNA 2

IFN: interferón

IFN-TAMs: TAMs estimulados por IFN

IGF: factor de crecimiento similar a la insulina

IIS: sistema inmunitario innato

IKK: IκB quinasa

IL: interleuquina

IL-R: receptor de IL

IMP: inosina monofosfato

Inflam-TAMs: TAMs enriquecidos en genes de citoquinas inflamatorias

INHBA: subunidad beta A de la inhibina

IRF: factor regulador de IFN

ISG: gen estimulado por IFN.

ITGB7: subunidad beta 7 de la integrina

JAK: Janus quinasa

JAKi: inhibidor de JAK

JAKi-GM-MØ: GM-MØ tratado con JAKi

Kla: lactilación de lisinas

LA-TAMs: TAMs asociados a lípidos

LD-MTX: bajas dosis de MTX

LGMN: legumaína

LIF: factor inhibidor de la leucemia

LIF-R: receptor de LIF

LLA: leucemia linfoblástica aguda

LPS: lipopolisácarido

LYVE: receptor de hialuronano endotelial de vasos linfáticos

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos

CSF1R: receptor de M-CSF

M-MØ: macrófago derivado de monocito *in vitro* estimulado con M-CSF

- M1:** macrófagos de perfil proinflamatorio
- M2:** macrófagos de perfil antiinflamatorio
- MAF:** homólogo del oncogén del fibrosarcoma musculoaponeurótico
- MAFB:** homólogo B del oncogén del fibrosarcoma musculoaponeurótico
- MAM:** macrófago asociado a metástasis
- MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos
- MARE:** elementos de reconocimiento de MAF
- MDM:** macrófago derivado de monocito
- MEK:** quinasa de MAPK
- MET:** metionina
- MFGE8:** factor 8 del factor de crecimiento epidérmico de la globulina de la grasa de la leche
- MHC:** complejo de histocompatibilidad
- MKI67:** marcador de proliferación Ki-67
- MM:** mieloma múltiple
- MMP:** metaloproteínasa de matriz
- MNP:** fagocito mononuclear
- MRC:** receptor de manosa de tipo-C
- MTHFR:** 5-metil-THF reductasa
- mTOR:** diana de la rapamicina en mamíferos
- MTX:** metotrexato
- MTX-M-MØ:** M-MØ tratado con HD-MTX
- MTX-PG:** poliglutamatos de MTX
- NF-kB:** factor nuclear-kB
- NK:** linfocito *natural killer*
- NSAID:** fármaco antiinflamatorio no esteroideo
- NSCLC:** cáncer de pulmón de células no pequeñas
- OSM:** oncostatina M
- OSM-R:** receptor de OSM
- PADI:** peptidil arginina deiminasa
- PAMP:** patrón molecular asociado a patógeno
- PCFT:** transportador de folato acoplado a protones

ÍNDICE DE CONTENIDO

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDH: piruvato deshidrogenasa

PDL1: ligando 1 del programa de muerte celular

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa

PIAS: proteína inhibidora de STATs activados

PMX: pemetrexed

PRL-R: receptor de la prolactina

Prolif-TAMs: TAMs proliferativos

PRR: receptor de reconocimiento de patrones

PTP: proteína tirosina fosfatasa

PTPN: proteína tirosina fosfatasa no receptora

PTX: pentraxina

RA: artritis reumatoide

Reg-TAMs: TAMs inmunoreguladores

RF: factor reumatoide

RFC: transportador de folatos reducidos

RNA: ácido ribonucleico

RNAseq: secuenciación de RNA

RTM-TAMs: TAMs similares a TRMs

SAM: S-adenosil-metionina

scRNA-seq: Secuenciación de RNA de célula única

SH2: dominio de homología Src 2

SLC: transportador de soluto

SLE: lupus eritematoso sistémico

SOCS: supresor de la señalización de citoquinas

SpA: espondiloartritis

SPP1: osteopontina

STAT: transductor de señales y activador de la transcripción

STING: proteína estimuladora de genes de interferón

STM: macrófago de tejido sinovial

TAM: macrófago asociado a tumor

TGF-B: factor de crecimiento transformante B

Th: linfocito T colaborador

THBS: trombospondina

THF: tetrahidrofolato

TIM1: receptor celular 1 del virus de la hepatitis A

TLR: receptor de tipo Toll

TNF: factor de necrosis tumoral

TNF-R: receptor de TNF

TPO: trombopoyetina

TPO-R: receptor de TPO

Treg: linfocito T regulador

TREM: receptor desencadenante expresado en células mieloides

TRM: macrófago residente de tejido

TS: timidilato sintasa

tsDMARD: DMARD sintético dirigido

TSLP: linfopoyetina estromal tímica

TYK2: tirosina quinasa 2

Upa-GM-MØ: GM-MØ tratado con upadacitinib

VCAN: versicano

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

RESUMEN

Los macrófagos son células del sistema inmunitario innato cuya plasticidad juega un papel importante tanto en el establecimiento de un proceso inflamatorio como en la resolución de la inflamación y el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos del organismo. Así, una desregulación desmedida de sus funciones puede causar la aparición de enfermedades y favorecer su agravamiento. Como si de dos polos opuestos se tratase, los macrófagos presentan dos estados de polarización: el perfil proinflamatorio (M1) y el perfil antiinflamatorio (M2). Estudios anteriores han relacionado estos dos perfiles con los macrófagos derivados de monocitos estimulados *in vitro* con el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos GM-CSF (GM-MØ) o con el factor estimulador de colonias de macrófagos M-CSF (M-MØ), respectivamente.

El perfil de polarización M2 se relaciona comúnmente con los macrófagos asociados a tumores (TAMs) en cáncer. En este trabajo se estudia el efecto transcripcional y funcional de dosis altas de metotrexato (HD-MTX), un fármaco antifolato empleado durante décadas para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, sobre M-MØ. El transcriptoma de los M-MØ está enriquecido en la firma genética que define a TAMs que tienen actividad protumoral (TAMs “grandes”). HD-MTX inducen un aumento de expresión de los genes proinflamatorios *IL1B* e *INHBA* en M-MØ, y el transcriptoma resultante se asemeja al de TAMs “pequeños” de perfil antitumoral. También fuerza la adquisición de un fenotipo $IL-6^{high}IFN\beta1^{high}IL-10^{low}$ en respuesta a señales de peligro. El efecto de reprogramación inducido por HD-MTX correlaciona con una reducción de la expresión y actividad del receptor de M-CSF (CSF1R), así como con una disminución en la expresión de los factores de transcripción MAF y MAFB, que son determinantes primarios del perfil génico y funcional de los M-MØ, y cuya actividad depende de GSK3. De hecho, la capacidad reprogramadora de HD-MTX sobre macrófagos humanos hacia un fenotipo antitumoral se puede prevenir mediante la inhibición de GSK3. Además del efecto antiproliferativo en la célula tumoral, los resultados establecen que HD-MTX tienen un efecto reprogramador en macrófagos. Los resultados sugieren que el eje $GSK3\beta$ -MAFB/MAF constituye una potencial diana en estrategias antitumorales focalizadas en macrófagos.

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad autoinmune e inflamatoria crónica que cursa con una inflamación severa de la membrana sinovial (sinovitis), y se caracteriza por la extravasación de monocitos de sangre periférica que dan lugar a macrófagos derivados de monocitos (MDMs), y por un aumento en la proliferación de fibroblastos. Los macrófagos en este contexto adquieren un perfil de polarización proinflamatorio y producen una gran cantidad de citoquinas (IL-6, TNF- α , GM-CSF) que exacerban el proceso inflamatorio, lo que culmina con la destrucción del hueso cercano a la articulación y lleva a una rigidez extrema de las articulaciones. En este trabajo se explora el efecto transcripcional y funcional de los inhibidores de Janus quinasas (JAKi) sobre la diferenciación de macrófagos derivados de monocitos en presencia de GM-CSF, factor que impulsa el desarrollo y la patogénesis de la RA. Los JAKi, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintéticos dirigidos (tsDMARDs) de segunda línea, son moléculas pequeñas inhibitorias de las Janus quinasas (JAKs), una familia de enzimas (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2) asociadas a receptores de citoquinas y hormonas que activan rutas de señalización implicadas en procesos patológicos y fisiológicos. El receptor de GM-CSF (GM-CSFR) se asocia a un homodímero de JAK2 que es inhibido por los JAKi de manera dosis-dependiente. Los JAKi inducen un aumento de expresión génica y proteica de MAFB y de genes dependientes de MAFB (IL-10, CD163, LGMN) en los GM-MØ. Desde el punto de vista transcripcional, sesga a los macrófagos hacia la adquisición de un perfil antiinflamatorio que está enriquecido positivamente en genes de macrófagos sinoviales asociados a la resolución de la inflamación, efecto que es dependiente

del factor de transcripción MAFB. Los GM-MØ tratados con JAKi aumentan la producción de IL-10 y disminuyen la concentración de IL-6 en respuesta a LPS. También tienen mayor actividad fagocítica y eferocítica, funciones fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis y que son propias de M-MØ y de macrófagos residentes de tejido. *In vivo*, resultados preliminares del estudio observacional JAKi_MONOMAC en pacientes con RA activa que no responden adecuadamente al tratamiento con DMARDs sintéticos convencionales (csDMARDs) o biológicos (bDMARDs), han permitido descubrir que el tratamiento con JAKi recupera la frecuencia de las subpoblaciones alteradas de monocitos de sangre periférica (clásicos, intermedios y no clásicos) a las proporciones encontradas en población sana.

En esta tesis se propone al factor de transcripción MAFB como uno de los agentes implicados en el proceso de reprogramación inducido por HD-MTX y JAKi en los macrófagos humanos derivados de monocitos. Dado que la actividad de MAFB depende de GSK3, el eje GSK3/MAFB parece ser la diana farmacológica clave en la reprogramación de macrófagos como estrategia terapéutica en enfermedades inflamatorias.

ABSTRACT

Macrophages are cells of the innate immune system whose plasticity plays a crucial role in both establishing an inflammatory process and resolving inflammation, as well as maintaining tissue homeostasis. Therefore, excessive dysregulation of their functions can lead to the onset of diseases and contribute to their progression. Like two opposite poles, macrophages exhibit two polarization states: the pro-inflammatory profile (M1) and the anti-inflammatory profile (M2). Previous studies have linked these two profiles with macrophages derived from monocytes stimulated *in vitro* with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor GM-CSF (GM-MØ) or with macrophage colony-stimulating factor M-CSF (M-MØ), respectively.

The M2 polarization profile is commonly associated with tumor-associated macrophages (TAMs) in cancer. This work investigates the transcriptional and functional effects of high-dose methotrexate (HD-MTX), an antifolate drug used for decades in the treatment of various types of cancer, on M-MØ. The transcriptome of these macrophages is enriched in the gene signature that defines protumoral TAMs ("large" TAMs). HD-MTX induces an increase in the expression of pro-inflammatory genes *IL1B* and *INHBA* in M-MØ. The resulting transcriptome resembles that of "small" TAMs with an antitumoral profile. Also, drives the acquisition of an $IL-6^{high}IFN\beta1^{high}IL-10^{low}$ phenotype in response to danger signals. The reprogramming effect induced by HD-MTX correlates with a reduction in the expression and activity of the M-CSF receptor (CSF1R), as well as a decrease in the expression of transcription factors MAF and MAFB, which are primary determinants of the gene and functional profiles of M-MØ, and whose activity depends on GSK3. In fact, the reprogramming ability of HD-MTX on human macrophages toward an antitumoral phenotype can be prevented by inhibiting GSK3. In addition to its antiproliferative effect on tumor cells, the results demonstrate that HD-MTX exerts a reprogramming effect on macrophages. The findings suggest that the GSK3 β -MAFB/MAF axis represents a potential therapeutic target in macrophage-focused antitumoral strategies.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune and inflammatory disease characterized by severe inflammation of the synovial membrane (synovitis) and is marked by the extravasation of peripheral blood monocytes that give rise to monocyte-derived macrophages (MDMs) and increased fibroblast proliferation. In this context, macrophages acquire a pro-inflammatory polarization profile and produce large amounts of cytokines (IL-6, TNF- α , GM-CSF) that exacerbate the inflammatory process, ultimately leading to the destruction of bone near the joint and resulting in extreme joint stiffness. This work explores the transcriptional and functional effects of Janus kinase inhibitors (JAKi) on the differentiation of monocyte-derived macrophages in the presence of GM-CSF, a factor driving the development and pathogenesis of RA. JAKi, second-line targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (tsDMARDs), are small molecules that inhibit Janus kinases (JAKs), a family of enzymes (JAK1, JAK2, JAK3, and TYK2) associated with cytokine and hormone receptors that activate signaling pathways implicated in both pathological and physiological processes. The GM-CSF receptor (GM-CSFR) is associated with a JAK2 homodimer that is inhibited by JAKi in a dose-dependent manner. JAKi induce increased gene and protein expression of MAFB and MAFB-dependent genes (IL-10, CD163, LGMN) in GM-MØ. At the transcriptional level, JAKi shift macrophages toward an anti-inflammatory profile that is positively enriched with genes associated with synovial macrophages involved in inflammation resolution, an effect that is dependent on the MAFB transcription factor. GM-MØ treated with JAKi show increased IL-10 production and decreased IL-6 levels in response to LPS. They also display enhanced phagocytic and efferocytic activity, which are critical functions for maintaining homeostasis and are characteristic of M-MØ and tissue-resident macrophages. *In vivo*, preliminary results from the observational JAKi_MONOMAC

ABSTRACT

study in patients with active RA who do not respond adequately to conventional synthetic DMARDs (csDMARDs) or biologic DMARDs (bDMARDs), have revealed that JAKi treatment restores the frequency of altered peripheral blood monocyte subpopulations (classical, intermediate, and non-classical) to levels found in healthy individuals.

This thesis proposes the transcription factor MAFB as one of the key agents involved in the reprogramming process induced by HD-MTX and JAKi in human monocyte-derived macrophages. Given that MAFB activity depends on GSK3, the GSK3/MAFB axis appears to be the key pharmacological target in macrophage reprogramming as a therapeutic strategy in inflammatory diseases.

INTRODUCCIÓN

Sistema fagocítico mononuclear humano: monocitos y macrófagos

Monocitos

Los monocitos son células del sistema inmunitario innato (IIS) que se originan en la médula ósea a partir de células madre precursoras hematopoyéticas (HSPCs) y de precursores mieloides, y son liberados al torrente sanguíneo donde poseen una vida media de uno a siete días. Pueden diferenciarse a macrófagos o células dendríticas tras extravasarse a los distintos tejidos. Su destino celular dependerá de las señales y factores estimulantes presentes en los distintos lugares de infiltración ¹.

En sangre periférica, los monocitos circulantes representan en torno a un 5-10% del total de células inmunitarias ²⁻⁴ y se distinguen tres subpoblaciones en base a la expresión de los marcadores *cluster of differentiation* (CD)14 y CD16 ^{5,6}, y HLA-DR ⁷:

- Los monocitos clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻HLA-DR⁻) representan el 85% del total de monocitos en sangre periférica y permanecen en sangre alrededor de 0,4-2,4 días dependiendo de las necesidades fisiológicas ^{8,9}. Basalmente, los monocitos clásicos permanecen en sangre periférica y, con el tiempo, se convierten en monocitos no clásicos, tras pasar por un estado previo como monocito intermedio ⁸. Mediante receptores de quimioquinas C-C (CCRs), fundamentalmente CCR2, salen de médula ósea y viajan rápidamente a través del torrente sanguíneo ^{10,11}. Una vez es detectado el ligando específico producido en el tejido dañado, son capaces de extravasarse a ese tejido y actuar en el sitio de la inflamación, donde producen citoquinas (como S100A12) en respuesta a los estímulos inflamatorios y participan en el proceso de reparación tisular ^{1,8,12}. Tras el proceso inflamatorio, este tipo de monocitos puede servir como fuente de nuevos macrófagos o células dendríticas residentes de tejido ^{13,14}.
- Los monocitos intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺HLA-DR⁺⁺) suponen el 5% del total de monocitos en sangre periférica y poseen una vida media de uno a cuatro días ^{8,9}. Los monocitos intermedios tienen su origen en el proceso de maduración de los monocitos clásicos. En condiciones fisiológicas, estos monocitos permanecen en sangre periférica y maduran a monocitos no clásicos ⁸. Cuando se establece un proceso inflamatorio, tanto monocitos clásicos como monocitos intermedios se extravasan al tejido dañado, pero estos últimos se caracterizan por una elevada capacidad de presentación antigénica, relacionada con una mayor expresión de los genes implicados en la presentación de antígenos (como *CLEC10A*) y de activación de los linfocitos T en comparación con los monocitos clásicos ⁶. Como los monocitos clásicos, pueden responder a los estímulos patogénicos liberando citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1β (IL-1β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) ¹⁵.

- Los monocitos no clásicos o monocitos de patrullaje (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺) representan el 10% de monocitos totales en sangre periférica y son los que poseen la vida media más larga, entre dos y siete días ^{8,9}. Son la forma madurativa final de los monocitos clásicos, que se han mantenido en el torrente sanguíneo con el objetivo de monitorizar la integridad del endotelio vascular ¹⁶. Se mueven más lentamente, prácticamente adheridos a la superficie del endotelio vascular gracias a la expresión de proteínas implicadas en el control del citoesqueleto. Este control sobre el citoesqueleto les permite, además, poseer una mayor actividad fagocítica, lo que explica su papel como células de “patrullaje” ⁸.

Macrófagos

Los macrófagos son componentes clave del IIS que residen en prácticamente todos los tejidos de mamíferos adultos y representan en torno al 10-15% del total de células de estos, donde funcionan como centinelas del sistema inmunitario. Los macrófagos presentan funciones comunes en todos los tejidos, como la función de vigilancia que mantiene la homeostasis del tejido (reconociendo y eliminando células senescentes o anómalas), y la función protectora (reaccionando frente a daño tisular o infecciones mediante el inicio, desarrollo y resolución de la respuesta inflamatoria) ^{17,18}

Los macrófagos pueden clasificarse en dos tipos según su ontogenia: los macrófagos residentes de tejido (TRMs) procedentes del saco vitelino o del hígado fetal durante el desarrollo embrionario ¹⁹, y los macrófagos derivados de monocitos procedentes de médula ósea (MDMs) ²⁰. Como consecuencia, el tejido adulto se compone de un mosaico de las tres poblaciones de macrófagos ontogénicamente diferentes: los macrófagos primitivos del saco vitelino, los macrófagos derivados de monocitos del hígado fetal y los MDMs ^{18,21}. En el adulto, la población de TRMs tiene la capacidad de autorrenovarse, pero también puede derivar de monocitos de sangre periférica en menor medida ^{19,22}. Los TRMs exhiben, por tanto, una gran diversidad fenotípica y funcional dependiente de su origen ontogénico, su perfil genético y epigenético, su tejido de residencia (y su localización dentro de este), y de los factores y señales tisulares presentes en el microambiente local ²¹. Esto da lugar a que los TRMs muestren un espectro de estados de activación muy amplio, en cuyos extremos encontramos a los macrófagos M1, como representantes del perfil proinflamatorio con funciones microbicidas e inmunoestimuladoras, y a los macrófagos M2, como representantes del perfil antiinflamatorio, con funciones de eliminación de células senescentes o anómalas, e inmunomoduladoras ^{18,21,23-25}. De manera general, los TRMs muestran una configuración por defecto similar al perfil M2.

Estados de activación de los macrófagos

Los macrófagos son células con una gran plasticidad, propiedad que les permite “adaptarse” a su entorno para responder de manera eficaz a los estímulos y ejercer sus funciones. Existen diversos factores a través de los cuáles los macrófagos adquieren

diferentes estados de activación (**Fig. 1**). Los factores intrínsecos, como el perfil génico o funcional del macrófago, determinan su capacidad para responder ante estímulos, como señales de daño tisular o infecciones ²¹. Mutaciones en el gen *Spi1* en ratones, que codifica para el factor de transcripción PU.1, implicado en la diferenciación de macrófagos, se han visto relacionadas con el desarrollo de enfermedades como la leucemia, el lupus eritematoso sistémico (SLE) o la artritis reumatoide (RA) ^{26,27}. Otros factores de transcripción, como la proteína de unión al potenciador/CCAAT (C/EBP), MAF y MAFB junto a PU.1 dan forma a la identidad y a las funciones de los TRMs ¹⁷. Entre las funciones de los macrófagos, aquellos que mantienen una fagocitosis activa se han asociado con un perfil más antiinflamatorio ²¹.

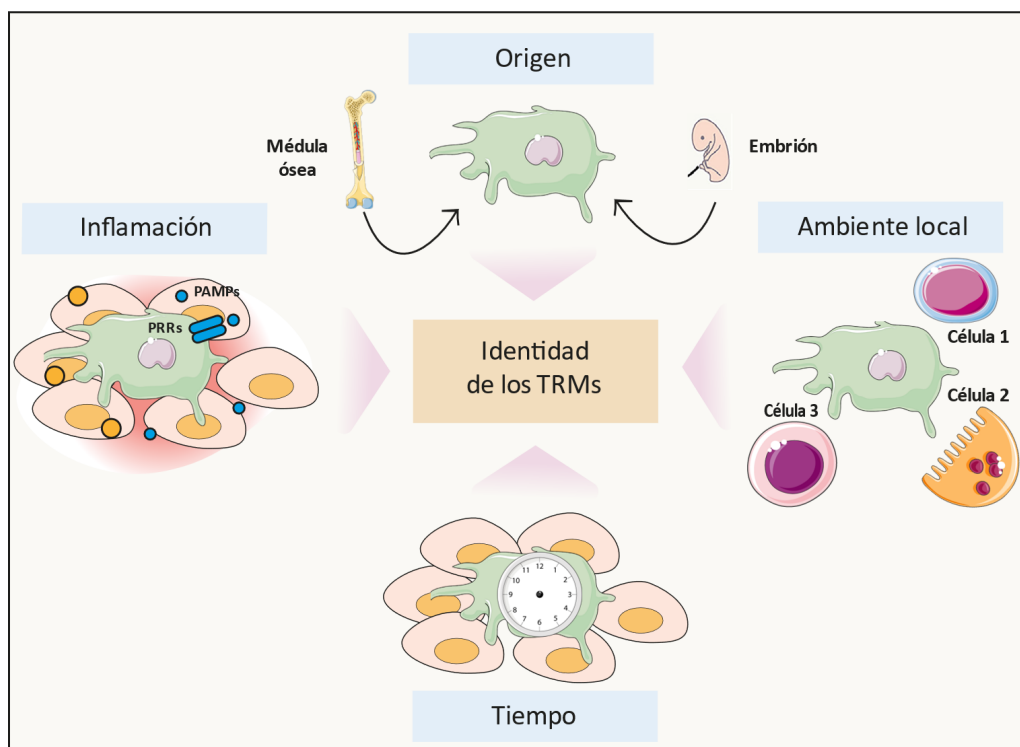


Figura 1. Factores que promueven la identidad de los TRMs. La identidad de los TRMs viene dada por: su origen, el ambiente tisular, el estado inflamatorio y el tiempo de residencia en el tejido. Adaptada de ²¹.

Otro de los factores determinantes del estado de activación y de la identidad de los TRMs son aquellos asociados al tejido o nicho de residencia del macrófago. Desde etapas tempranas del desarrollo, los tejidos embrionarios que alojan a los macrófagos liberan una serie de señales que modifican su identidad de manera dependiente del tejido y del tiempo. Así, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) es necesario para el desarrollo y las funciones de los macrófagos alveolares, mientras que el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) es una de las principales citoquinas conductoras de la adquisición del perfil antiinflamatorio en los TRMs. Incluso, otras células presentes en el mismo tejido son capaces de modificar el perfil de los macrófagos como ocurre, por ejemplo, en el hígado, donde la acción que ejercen las células estrelladas y endoteliales sobre los macrófagos da lugar a la adquisición del perfil de los macrófagos residentes del hígado o células de Kupffer. Es importante resaltar que, en los tejidos, no solo

hay un tipo de macrófago, sino que pueden encontrarse diferentes subpoblaciones. Por ejemplo, en hígado no solo residen células de Kupffer, sino que también encontramos macrófagos capsulares, MDMs y macrófagos peritoneales remanentes de una respuesta inflamatoria anterior. Los TRMs también son capaces de responder a las señales extratisulares producidas por células de otros tejidos formando una red integradora de señales a distancia. Se ha observado en ratones con insuficiencia cardíaca que el sistema nervioso es capaz de estimular a los TRMs de riñón para producir GM-CSF y liberarlo al torrente sanguíneo. Este GM-CSF llega al tejido cardíaco y actúa sobre los TRMs del corazón, lo que les permite controlar la actividad de los cardiomiocitos y la presión cardíaca ²¹.

Por último, el ambiente inflamatorio en los tejidos ha mostrado ser un factor clave para el proceso de diferenciación y para la adquisición de funciones en los TRMs y MDMs. La liberación de citoquinas proinflamatorias como la IL-6, la IL-1 β , el TNF- α y el GM-CSF, contribuyen a la adquisición del perfil proinflamatorio de los macrófagos presentes en el tejido. Una vez que el proceso inflamatorio ha terminado, otras citoquinas como la IL-10 o el M-CSF enfrían la respuesta inflamatoria y los macrófagos recuperan su perfil homeostático. Adicionalmente, los macrófagos que derivan de precursores de médula ósea pueden adquirir el programa transcripcional de los macrófagos de origen embrionario a los que reemplazan en el tejido tras la resolución de la inflamación ^{17,21}.

Todo esto implica que, a pesar de que los TRMs poseen un programa transcripcional y funcional definido por el tejido, siguen teniendo la capacidad de adaptarse a los nuevos entornos que se generan en su tejido de residencia.

Clasificación de macrófagos: de subpoblaciones identificadas por secuenciación de célula única a modelos de polarización *in vitro* M1 y M2

El avance en la tecnología de secuenciación masiva ha permitido el desarrollo de técnicas que permiten diferenciar subpoblaciones celulares en los tejidos humanos. Tal es el caso de la actual y reciente técnica de secuenciación de célula única *scRNA-seq*. Lo más destacable de esta técnica es que el ácido ribonucleico (RNA) de cada célula presente en un tejido es analizado por separado y posee un número de identificación propio que lo diferencia del resto. Esto ha permitido el desarrollo de bases de datos públicas (como el *Human Cell Atlas Consortium*) de poblaciones de células inmunitarias y no inmunitarias en el contexto de la salud y la enfermedad ²¹. Estos últimos avances subrayan la gran diversidad de macrófagos localizados en los tejidos del organismo, lo que supone un gran reto para acercar los estudios *in vitro* a la realidad de los tejidos *in vivo*. Más adelante se describirán las subpoblaciones de macrófagos presentes en el entorno tumoral, así como aquellos presentes en la membrana sinovial de RA, como ejemplo de la complejidad de la polarización *in vivo*. No obstante, numerosos estudios *in vitro* realizados con macrófagos M1 y M2 ²⁸⁻³² han servido para explicar diferentes aspectos de sus funciones *in vivo* en el contexto de estas patologías ^{33,34}. Por todo ello, para el desarrollo de esta tesis hemos utilizado macrófagos diferenciados *in vitro* a partir de monocitos humanos con GM-CSF (para el perfil M1) o con M-CSF (para el perfil M2) (**Fig. 2**).

Los monocitos pueden diferenciarse *in vitro* a macrófagos M1 en respuesta a diferentes factores, como el tratamiento combinado de interferón γ (IFN- γ) más

lipopolisacárido (LPS), o mediante GM-CSF³⁵⁻³⁷. El GM-CSF, codificado por el gen *CSF2*, es un factor que promueve la diferenciación de monocitos hacia macrófagos de perfil proinflamatorio y antitumoral (IL-10^{low}TNF- α ^{high}IL-6^{high}), efecto que depende en gran medida de Activina A³⁸⁻⁴⁰. La Activina A, codificada por el gen *INHBA*, es una proteína expresada ampliamente en multitud de tejidos y células, que tiene la capacidad de promover efectos proinflamatorios en el inicio y en el desarrollo de un proceso inflamatorio, de una manera dependiente de la concentración⁴¹. Además, en estudios realizados sobre macrófagos *in vitro*, se ha observado que promueve la adquisición de genes característicos de la polarización dependiente de GM-CSF (*CCR2*, *EGLN3*, *CCL17*), y limita la adquisición de genes dependientes de la polarización mediada por M-CSF (*FOLR2*, *IL10*, *IGF1*), así como de la producción de IL-10 en respuesta a LPS^{28,40}. La concentración sistémica de GM-CSF es muy baja en individuos sanos y solamente aumenta en condiciones de inflamación⁴². En tejidos humanos, el GM-CSF es producido por una amplia variedad de células inmunitarias como linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos, y por otros tipos celulares como los fibroblastos o las células endoteliales^{42,43}. Tras la unión del GM-CSF a su receptor (GM-CSFR), se inicia una cascada de señalización que activa a determinados factores de transcripción que regulan la expresión de genes proinflamatorios. Entre los factores de transcripción implicados en la adquisición del perfil proinflamatorio se encuentran: el transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1)^{44,45} y STAT5⁴⁶, el factor regulador de interferón 5 (IRF5)^{47,48} y el factor nuclear- κ B (NF- κ B)⁴⁹. Los macrófagos derivados de monocitos *in vitro* estimulados con GM-CSF (GM-M \emptyset) adquieren un perfil de expresión génica caracterizado por la expresión de *MMP12*, *CCL17*, *CCR2*, *CD1B*, *CLEC7A*, *ECSCR*, *EGLN3*, *INHBA* y *TNF*^{28,50,51}. En membrana, se caracterizan por una alta expresión de las proteínas CD80, CD86, complejo de histocompatibilidad II (MHCII), receptor de IL-1 (IL-1R), receptor de tipo Toll 2 (TLR2) y TLR4⁵². Producen concentraciones elevadas de Activina A^{28,53}, y en respuesta a ligandos de TLRs producen grandes concentraciones de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-23, TNF- α , Activina A) y de quimioquinas reclutadoras de diferentes tipos de células inmunitarias (CCL7, CCL17), y bajas concentraciones de IL-10^{28,51,54-56}.

Los macrófagos son responsables del control de la respuesta inflamatoria⁵⁷, mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como el LPS o el imiquimod, o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), como proteínas citosólicas o nucleares, a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como los TLRs o los receptores de lectina tipo C (CLRs)³. Esta señalización estimula la producción de mediadores que reclutarán a neutrófilos y monocitos que promoverán la respuesta proinflamatoria¹⁵. A su vez, los GM-M \emptyset producen grandes cantidades de TNF- α , IL-12 e IL-23, lo que activa las respuestas de los linfocitos T colaboradores 1 (Th1) y Th17⁵⁸. Los linfocitos T producen el IFN- γ necesario para la adquisición del perfil proinflamatorio en los macrófagos y retroalimentan el proceso proinflamatorio⁵⁹. La respuesta Th17 está implicada en procesos inflamatorios crónicos y en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, como la RA, la aterosclerosis, la fibrosis pulmonar y la enfermedad de Crohn, por lo que los GM-M \emptyset son una diana esencial para el manejo de estas enfermedades^{60,61}.

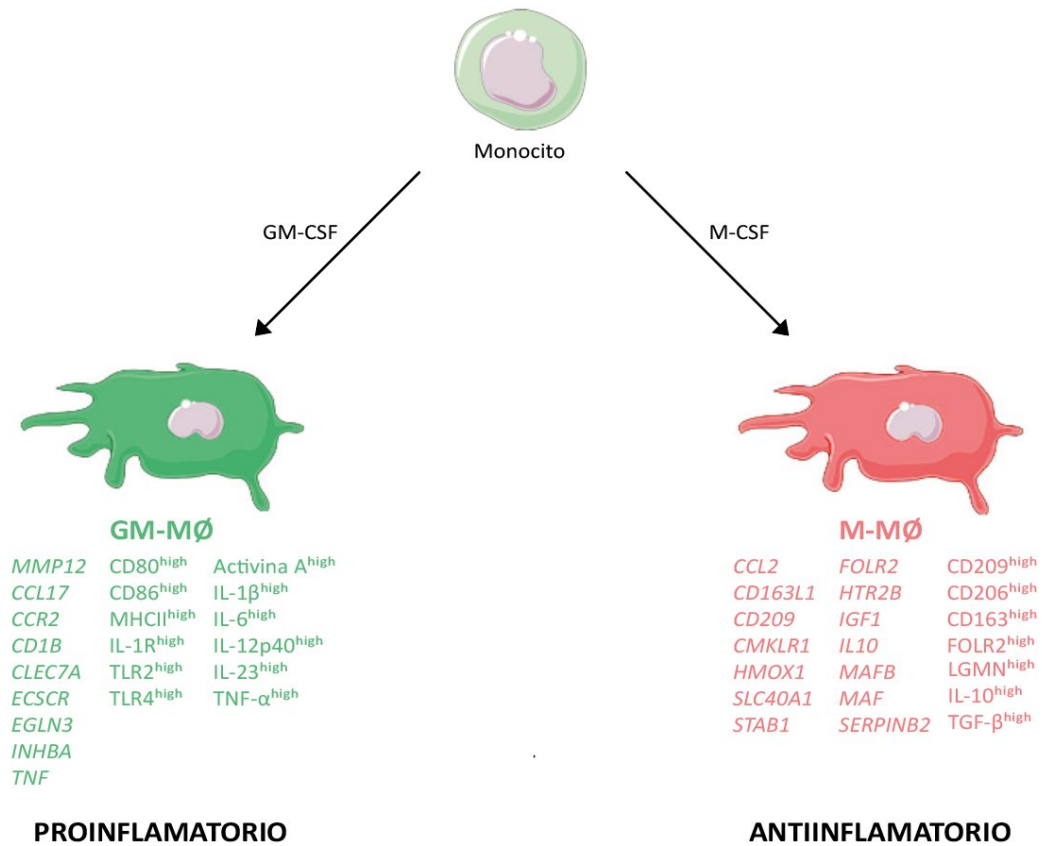


Figura 2. Sistema de diferenciación *in vitro* de monocitos a macrófagos humanos y marcadores característicos de cada perfil de polarización. Los factores estimulantes de colonias GM-CSF y M-CSF promueven la diferenciación de monocitos a macrófagos GM-MØ y M-MØ, respectivamente. Se representan algunos de los genes característicos y marcadores proteicos (en función de su mayor expresión, *high*) de cada perfil de polarización.

Los macrófagos M2 de perfil antiinflamatorio pueden obtenerse *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica estimulados por IL-4 o por M-CSF. El M-CSF promueve la diferenciación de monocitos hacia macrófagos de perfil antiinflamatorio e inmunosupresor similar a M2 ⁶² y regula su supervivencia, proliferación y quimiotaxis ⁶³⁻⁶⁵. Esta proteína está codificada por el gen *CSF1*, y se produce por diferentes tipos celulares como células del músculo liso, osteoblastos, macrófagos, fibroblastos y células del endotelio ^{39,66}. Los macrófagos derivados de monocitos *in vitro* estimulados con M-CSF (M-MØ) adquieren un perfil génico caracterizado por la expresión de *CCL2*, *CD163L1*, *CD209*, *CMKLR1*, *HMOX1*, *SLC40A1*, *FOLR2*, *HTR2B*, *IGF1*, *IL10*, *MAFB*, *MAF*, *SERPINB2* y *STAB1* ^{28,29,51,54,67-70}. En membrana, se caracterizan por una alta expresión de las proteínas CD209 ³⁰, CD206, CD163 ⁵² y FOLR2 ²⁹. Producen concentraciones elevadas de Legumina (LGMN) ⁷¹, y en respuesta a ligandos de TLRs producen grandes concentraciones de citoquinas antiinflamatorias (IL-10 y TGF-β) ^{51,72}.

Para la adquisición del perfil antiinflamatorio en los M-MØ es necesaria la participación de diferentes factores de transcripción, entre los que se encuentran MAFB ⁷³ y MAF ^{68,74,75}. MAFB y MAF pertenecen a la familia de factores de transcripción de la proteína activadora 1 (AP-1) ⁷⁶, a la que también pertenecen los factores Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2), ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) y el resto

de los miembros de la subfamilia MAF (MAFA, MAFG/F/K, NRL). De manera muy conservada, todos poseen el dominio básico de cremallera de leucina (bZIP) que les permite unirse al ácido desoxirribonucleico (DNA) y formar homodímeros y heterodímeros. La subfamilia MAF posee un dominio de homología adicional llamado región de homología extendida (EHR), que le permite reconocer secuencias de DNA más largas que las que reconocen el resto de los miembros de la familia AP-1. Esta región reconoce sitios denominados elementos de reconocimiento de MAF (MARE) situados en las proximidades de sus genes diana ⁷⁷.

Específicamente, MAFB regula la transcripción de genes antiinflamatorios, como *CD163*, *IL10*, *CMKLR1* y *MS4A6A* ⁷⁰, que forman parte del transcriptoma de los macrófagos M2. Por ello, los macrófagos que sobreexpresan MAFB y/o algún otro miembro de la subfamilia MAF se han asociado con un perfil antiinflamatorio y protumoral ⁷⁷. Este hecho ha sido contrastado en diferentes patologías, como el cáncer o el COVID-19 severo, donde los macrófagos juegan un rol importante en la respuesta inmunitaria y donde se ha observado que MAFB está implicado directamente en la expresión de genes de perfil protumoral (*CCND2*, *ARK5*, *ITGB7*, *CXCL12*, *MAF*) y profibrótico (*CCL3*, *CCL13*, *CCL18*, *IL-10*, *SPP1*, *CD163*, *LGMN*, *CXCL13*) asociados con el establecimiento de dichas patologías ^{70,77}. MAFB se regula por diferentes modificaciones postraduccionales (sumoilaciones y fosforilaciones). Los residuos susceptibles de ser fosforilados son Ser49, Thr53, Thr57, Ser61 y Ser65 ⁷⁸, y la enzima encargada, principalmente, de esta tarea es la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) ⁷⁷. Esta enzima presenta dos isoformas en humanos, GSK3 α y GSK3 β , con la misma función quinasa sobre residuos de serina y treonina, y se regulan de manera similar mediante fosforilación en residuos de serina (Ser21 en GSK3 α , Ser9 en GSK3 β) que la inactivan, y tirosina (Tyr216 en GSK3 α , Tyr279 en GSK3 β) que la activan ⁷⁹. La fosforilación de MAFB por GSK3 regula su ubiquitinación y degradación, así como su papel como oncoproteína y sus funciones en diferenciación celular ⁷⁷.

Dentro de las funciones de los M-M \emptyset la más destacable es la fagocitosis. La fagocitosis es el proceso por el que determinados tipos celulares, como los macrófagos, modifican la morfología de sus membranas para englobar a células o restos celulares y formar fagolisosomas en el citoplasma, donde serán degradados. Este proceso es empleado por los macrófagos para eliminar patógenos causantes de infecciones en el organismo, así como para eliminar células apoptóticas resultantes de un proceso inflamatorio o como parte de la propia homeostasis del tejido, momento en el que el proceso pasa a denominarse eferocitosis ^{21,80}. Otra función de los M-M \emptyset consiste en “apagar” el proceso inflamatorio mediante la producción de citoquinas inmunomoduladoras como la IL-10 ⁵⁹, o mediante la estimulación del desarrollo de los linfocitos T reguladores (Tregs) ⁸¹.

A continuación, se definen los mecanismos de señalización de las citoquinas GM-CSF y M-CSF en la diferenciación de macrófagos *in vitro*.

El eje GM-CSF/GM-CSFR

El GM-CSF se describió como un factor de crecimiento hematopoyético gracias a su capacidad para formar colonias de granulocitos y macrófagos a partir de precursores de médula ósea *in vitro* ⁸². El GM-CSFR se localiza predominantemente en células mieloides, como los monocitos, los macrófagos, los neutrófilos y los eosinófilos ^{83,84}. Multitud de estudios han mostrado que una concentración elevada de GM-CSF y una mayor expresión de GM-CSFR está asociada con un gran número de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes ^{35,42,85}.

La señalización por GM-CSF comienza cuando este se une al GM-CSFR (**Fig. 3**). GM-CSFR es un receptor multimérico, miembro de la familia de receptores de citoquinas de tipo I, formado por dos cadenas: la cadena α de unión a ligando de baja afinidad, y la cadena β transductora de señales, que es común para los receptores de las citoquinas IL-3 e IL-5 ⁸⁶. Tras la unión del GM-CSF, la cascada de señalización es iniciada por la activación de un homodímero de la Janus quinasa 2 (JAK2) situada en la parte citosólica y asociada con la cadena β del receptor. La activación de JAK2 permite, a su vez, la activación y dimerización de STAT5, que se transloca al núcleo y se une al DNA en regiones específicas que regulan la transcripción de sus genes diana. Adicionalmente a la señalización JAK2-STAT5, se activan diferentes rutas de señalización secundarias: la vía de las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), la vía de la quinasa del 3-fosfoinosítido (PI3K) y la vía del factor nuclear- κ B (NF- κ B) ^{32,46,87}. Si la concentración inicial de GM-CSF es baja (<10 pM), se activará preferencialmente la ruta de la PI3K implicada en supervivencia celular. Por el contrario, si la concentración de GM-CSF es elevada (>10 pM), JAK2 fosforila diferentes residuos de Tyr de la cadena β común (Tyr577, Tyr612, Tyr695, Tyr750, Tyr806, y Tyr866), y se activarán las otras tres rutas, impulsando tanto la proliferación como la supervivencia celular ^{87,88}. La señalización del GM-CSF se encuentra regulada negativamente por la quinasa Lyn de la familia de quinasas Src ^{89,90}, y por los miembros de la familia de proteínas supresoras de la señalización de citoquinas (SOCS), SOCS1 ⁹¹ y la proteína SH2 inducida por citoquinas (CISH) ⁴⁶, mediante un ciclo de retroalimentación negativa.

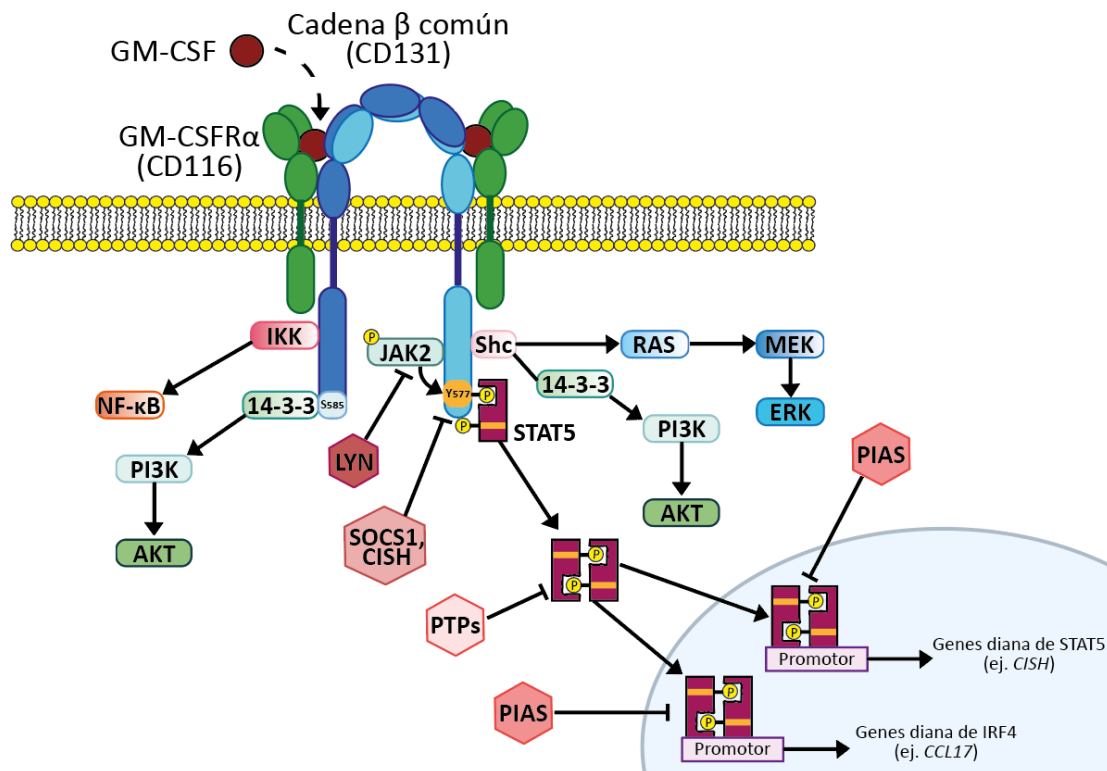


Figura 3. Rutas de señalización iniciadas por GM-CSF y su regulación. La unión del GM-CSF al complejo de su receptor (formado por dos cadenas α y dos cadenas β) produce la activación de diferentes rutas de señalización (NF-κB, PI3K-AKT, MAPK y JAK2-STAT5). La autofosforilación de JAK2 permite la fosforilación del residuo de Tyr577 de la cadena β del receptor, que activa y fosforila a STAT5 permitiendo su dimerización y translocación al núcleo, donde se unirá a las regiones promotoras que permiten la transcripción de sus genes diana. Los inhibidores de esta ruta incluyen: a la quinasa Lyn, a la familia SOCS/CISH, a las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) y a las proteínas inhibidoras de STATs activados (PIAS). Adaptada de ⁸⁶.

El eje M-CSF/CSF1R

El M-CSF fue el primero de la familia CSF en ser purificado ⁹². Las primeras observaciones mostraron su capacidad para promover el crecimiento de colonias de macrófagos ⁹³, y eso llevó a querer conocer cómo era su receptor y cómo funcionaba su señalización. Tras demostrar su actividad tirosina quinasa intrínseca ⁹⁴, se identificó que el receptor de M-CSF (CSF1R) juega un papel central en diversas enfermedades ⁶³. El CSF1R pertenece a la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y de manera similar al resto de miembros, posee una región extracelular altamente glicosilada compuesta de cinco dominios de inmunoglobulina (D1-D5), un dominio transmembrana y un dominio intracelular dividido en un dominio yuxtamembrana y un dominio tirosina quinasa intracelular adjunto a un dominio quinasa ⁹⁵⁻⁹⁷. Este receptor tiene muy baja expresión en las células madre hematopoyéticas (HSCs) ⁹⁸ y elevada expresión en monocitos y macrófagos tisulares ⁹⁹, osteoclastos y células dendríticas ¹⁰⁰, microglía ¹⁰¹ y células de Paneth ¹⁰². Su presencia en estos y otros tipos celulares confirma sus amplias acciones pleiotrópicas desde el punto de vista del desarrollo embrionario, la fisiología del adulto, el

sistema inmunitario innato, la inflamación, la reparación de tejidos y el microambiente tumoral ^{63,103,104}. IL-34 también es un ligando conocido del CSF1R ¹⁰⁵.

Cuando el M-CSF se une al CSF1R, éste dimeriza y se fosforila hasta en ocho residuos de tirosina diferentes (Tyr544, Tyr559, Tyr697, Tyr706, Tyr721, Tyr807, Tyr921 y Tyr974) ^{106,107}, lo que permite la fosforilación de sus proteínas diana PI3K, Src y GRB2 ¹⁰⁸. Esta señalización culmina con la activación y translocación al núcleo de determinados factores de transcripción, como C/EBP β ¹⁰⁹, que activa la transcripción de sus genes diana. La señalización por M-CSF/CSF1R en macrófagos regula su supervivencia, proliferación, quimiotaxis y diferenciación ⁶³⁻⁶⁵.

Los macrófagos asociados a tumor (TAMs)

El cáncer es una enfermedad heterogénea con multitud de factores genéticos y ambientales que contribuyen a su desarrollo. La masa tumoral hallada en el cáncer clínicamente establecido está compuesta por células tumorales y por el estroma tumoral, formando parte del microambiente tumoral. El estroma tumoral proporciona los componentes esenciales para el desarrollo y la supervivencia del tumor. Está formado por componentes de matriz extracelular, células (principalmente fibroblastos, células de origen inmunitario como los macrófagos, y células endoteliales), nervios y vasos sanguíneos. En comparación a la lámina propia normal, el estroma tumoral posee un mayor número de fibroblastos, llamados fibroblastos asociados a tumores (CAFs), que representan el componente celular principal del estroma y son clave para la progresión tumoral, la angiogénesis, la transición epitelio-mesénquima y la metástasis ^{110,111}. Por otro lado, la participación del IIS también es importante en el desarrollo del tumor, sobre todo por parte de los macrófagos. En cáncer, la infiltración de monocitos que se diferenciarán a macrófagos es un hallazgo frecuente en el tumor ^{112,113} y suponen hasta un 50% de las células de la masa tumoral ¹¹⁴. Habitualmente, los macrófagos asociados a tumores (TAMs) expuestos a factores derivados del tumor como el TGF- β , factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), M-CSF o IL-10, exhiben un perfil antiinflamatorio, inmunosupresor y protumoral. Esto contribuye a la progresión tumoral, a la aparición de metástasis e incluso al desarrollo de resistencias frente a las terapias habituales (quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia) ^{114,115}. El control de la polarización de los TAMs supone, por tanto, una diana terapéutica prometedora ^{114,116,117}.

No obstante, se ha observado la presencia de TAMs con perfil proinflamatorio en cáncer de páncreas, cáncer de mama y cáncer de endometrio ¹¹⁸. Es por ello por lo que no siempre se les puede atribuir un fenotipo antiinflamatorio o proinflamatorio en cáncer. Existen tumores, como el osteosarcoma o el tumor de esófago, donde la presencia de TAMs se asocia con buen pronóstico ^{119,120}. Pero el contexto tumoral no es tan sencillo, y es posible encontrar entornos tumorales como la metástasis en hígado del cáncer colorrectal en el que conviven TAMs “grandes”, asociados con mal pronóstico y perfil protumoral, con TAMs “pequeños”, asociados a buen pronóstico y perfil antitumoral ¹²¹. Dada esta enorme variedad de perfiles de TAMs entre tumores, una revisión reciente ¹²² ha creado un modelo de clasificación de TAMs (**Fig. 4**) en base a diferentes estudios de ómicas en cáncer (transcriptómica por *scRNA-seq*, epigenómica, metabolómica y ómicas espaciales). Así, han propuesto hasta siete subpoblaciones que pueden ser localizados en diferentes tumores: los

TAMs estimulados por IFN (IFN-TAMs), que se caracterizan por la expresión de genes regulados por IFN (*CXCL10*, *PDL1*, *ISG15*) y asociados al perfil M1 (*CD86*, *MHCII*), aunque también muestran similitud con macrófagos inmunosupresores y activadores de Treg; los TAMs inmunoreguladores (Reg-TAMs) que muestran una elevada expresión de genes asociados al perfil M2 (*ARG1*, *MRC1*, *CX3CR1*), pero cuya función se encuentra ligada al microambiente tumoral que les rodea; los TAMs enriquecidos en genes de citoquinas inflamatorias (Inflam-TAMs) cuya expresión elevada de *IL1B*, *CXCL1/2/3/8*, *CCL3* y *CCL3L1* permite regular la función y el reclutamiento de células inmunitarias durante la respuesta inmunitaria al tumor; los TAMs proangiogénicos (Angio-TAMs) promotores de múltiples aspectos de la progresión tumoral gracias a su elevada expresión en genes angiogénicos (*VEGFA*, *SPP1*, *VCAN*, *FCN1*, *THBS1*); los TAMs asociados a lípidos (LA-TAMs) también implicados en la progresión tumoral y en la supresión de la respuesta antitumoral debido a la expresión de genes asociados al metabolismo lipídico (*APOC1*, *APOE*, *ACP5*, *FABP5*); los TAMs similares a TRMs (RTM-TAMs), implicados en la invasión tumoral, similares a los TRMs de su tejido de residencia y que además muestran una firma génica análoga a la de precursores embrionarios (*LYVE1*, *HES1*, *FOLR2*); y por último, los TAMs proliferativos (Prolif-TAMs), cuya característica principal es su capacidad proliferativa a través de la expresión de *MKI67* y de genes del ciclo celular, como *CDK1* y *CDC45*, y que se han sugerido como TAMs antitumorales por su elevada expresión del gen proinflamatorio *HMGB1*.

Las funciones de los TAMs dependen del contexto espaciotemporal en el que se encuentra el desarrollo tumoral ¹²³. En los tumores primarios pueden controlar: la vascularización del nicho tumoral ^{124,125}, la inflamación ^{126,127}, la transición epitelio mesénquima previa a la metástasis ¹²⁸⁻¹³⁰, el remodelado de la matriz extracelular ¹³¹⁻¹³³, y la intravasación que da origen a la creación de “pasillos” para el escape tumoral y a la metástasis ¹³⁴. En el nicho premetastásico, los macrófagos preparan al tejido para el desarrollo del segundo tumor, liberando citoquinas ¹³⁵ o captando vesículas extracelulares provenientes de células del tumor primario que transportan RNAs, lípidos, metabolitos o proteínas que modulan sus funciones y fenotipo ¹²³. En la propia metástasis las células estromales liberan CCL2 que atraen químicamente a los monocitos de la circulación que expresan CCR2, dando lugar a los macrófagos asociados a metástasis (MAMs) ^{136,137}, que regulan la inmunosupresión ejercida sobre los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos ¹³⁸.

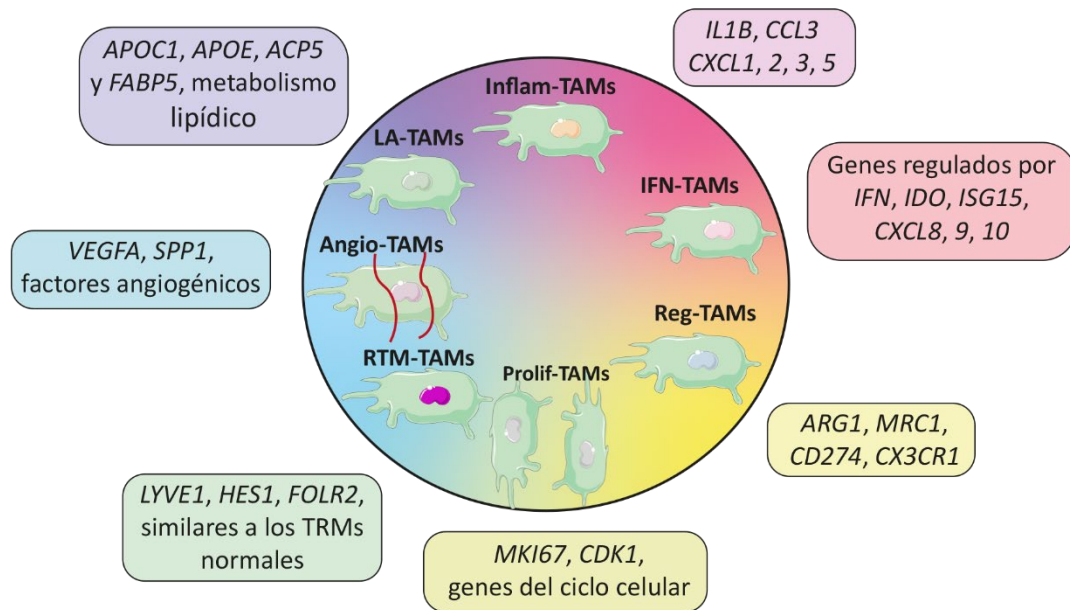


Figura 4. Clasificación propuesta por Ma et al., para las diferentes subpoblaciones de TAMs. A partir de los estudios de secuenciación de célula única (como scRNA-seq) y de diferentes ómicas (epigenómica, metabolómica y ómicas espaciales) se han perfilado siete subpoblaciones de TAMs: Inflam-TAMs, IFN-TAMs, Reg-TAMs, Prolif-TAMs, RTM-TAMs, Angio-TAMs y LA-TAMs. El espectro de color indica que la diversidad de TAMs es un continuo en los diferentes tipos de tumor. Adaptada de 122.

Fármacos de tipo antifolato en el tratamiento del cáncer

Los fármacos antifolato se emplean para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. El folato o ácido fólico, también llamado vitamina B9, es una coenzima que se presenta en dos formas activas, el dihidrofolato y el tetrahidrofolato (DHF y THF, respectivamente). Ambos están implicados en la síntesis de purinas y pirimidinas, en la síntesis de aminoácidos, en la regulación epigenética y en la defensa contra radicales libres en un complejo ciclo metabólico llamado metabolismo de las moléculas de un solo carbono (1C) ¹³⁹. El ciclo de 1C se encuentra fraccionado en el citoplasma y en la mitocondria ^{140,141}. Debido a sus importantes funciones, las células tumorales abusan del metabolismo de 1C para favorecer el crecimiento y la proliferación tumoral. Por ello, los fármacos antifolato tienen como diana terapéutica a las enzimas clave del ciclo 1C, como la dihidrofolato reductasa (DHFR) encargada de la síntesis del DHF, o la timidilato sintasa (TS) encargada de la síntesis del timidilato. Sin embargo, las células tumorales son capaces de generar resistencias frente a los antifolatos, bien desarrollando otras rutas que esquivan su efecto o bien limitando la capacidad de retención de los fármacos ^{142,143}. Además, un problema asociado al uso de los antifolatos es que afectan al resto de tejidos del organismo, dando lugar a efectos adversos que es necesario controlar, como daños de la mucosa gastrointestinal, supresión de la médula ósea y alteraciones renales y hepáticas ^{144,145}.

Los dos fármacos antifolatos más utilizados actualmente son el metotrexato (MTX), inhibidor específico de la DHFR, y el pemetrexed (PMX), inhibidor de la TS ¹⁴⁰. El MTX forma parte del tratamiento del cáncer de mama, del cáncer de cabeza y cuello, del linfoma no

Hodgkin, del osteosarcoma, del cáncer de vejiga, del coriocarcinoma y de la leucemia linfoblástica aguda (ALL), donde su empleo a dosis altas (HD-MTX, 500 mg/m²) mejora las tasas de recuperación y el pronóstico de los pacientes ^{141,146}. Para evitar la toxicidad, se combina el tratamiento con leucovorina o ácido folínico, forma reducida de ácido fólico (5-formil-THF) que compite con el MTX por el transporte de membrana, la poliglutamilación y la unión a la DHFR ¹⁴¹. El tratamiento con PMX se emplea como agente quimioterápico en mesotelioma pleural y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) ¹⁴⁷.

Mecanismo de acción del metotrexato (MTX) y del pemetrexed (PMX)

El MTX entra a las células a través del transportador de folatos reducidos (RFC), codificado por el gen *SLC19A1*, una proteína de membrana de expresión ubicua, y también a través del transportador de folato acoplado a protones (PCFT) en el intestino delgado ¹⁴⁸. En macrófagos, el MTX entra a través del RFC, si bien la expresión de este canal de transporte es mayor en los GM-MØ que en los M-MØ ^{53,141}. Una vez en el citosol (**Fig. 5**), la folilpoliglutamato sintasa (FPGS) añade residuos de glutamato en la cadena lateral γ -carboxilo del MTX, y esto lo convierte en la forma activa (MTX-PG). La adición de moléculas de glutamato (hasta 5) es dependiente de la concentración y del tiempo, y permite su retención en las células durante largos periodos, mejorando su actividad citotóxica. El MTX-PG inhibe a una serie de enzimas implicadas en el ciclo de 1C: la DHFR, la TS, la 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa (AICARFT/ATIC), la 5-metil-THF reductasa (MTHFR) y la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (GARFT) ¹⁴⁰. El balance entre la FPGS y la γ -glutamil hidrolasa (GGH, enzima que cataliza la eliminación de residuos de glutamato) es esencial para manejar la actividad farmacológica del MTX. El MTX con menos de 3 residuos de glutamato puede salir de la célula a través de las proteínas transportadoras dependientes de ATP (ABCC1-4 y ABCG2) ¹⁴¹. Estas proteínas son clave en la defensa contra agentes quimioterápicos ¹⁴⁹, y su sobreexpresión juega un papel importante en la generación de resistencias a fármacos ¹⁵⁰.

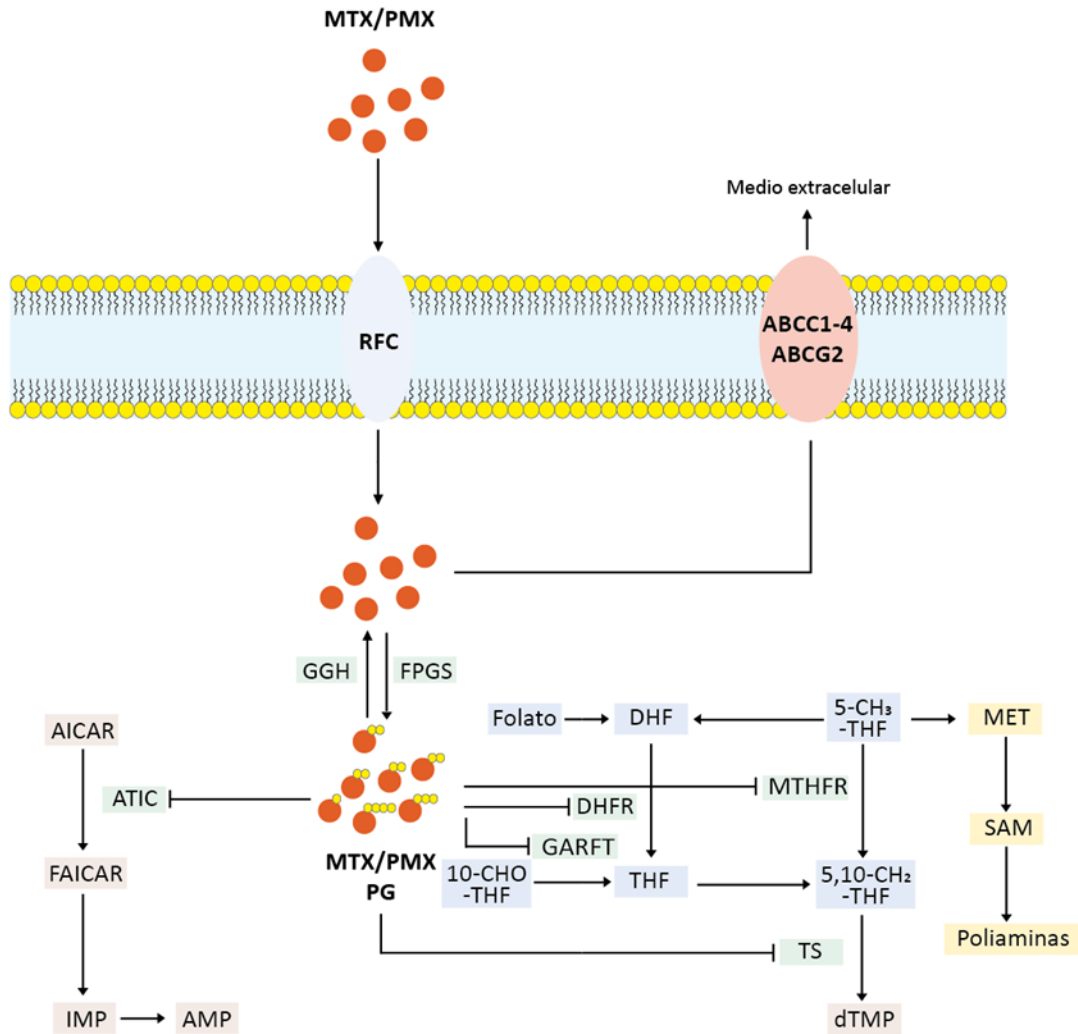


Figura 5. Mecanismo de acción de los antifolatos MTX y PMX en macrófagos. Tanto MTX como PMX entran en los macrófagos a través del RFC y son convertidos rápidamente en su forma activa (MTX-PG/PMX-PG). En su forma activa son capaces de inhibir en mayor medida a las enzimas del ciclo del folato (DHFR, MTHFR y GARFT), y a las enzimas implicadas en la síntesis de nucleótidos (TS y ATIC). FAICAR: 5-formamidoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido; IMP: Inosina monofosfato; AMP: adenosina monofosfato; 10-CHO-THF: 10-formil-THF; 5-CH₃-THF: 5-metil-THF; 5,10-CH₂-THF: 5,10-dimetil-THF; dTMP: desoxitimidina monofosfato; MET: metionina; SAM: S-adenosil-metionina.

De manera similar al MTX, el PMX es un antifolato que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos, reduciendo la actividad de las enzimas del ciclo de 1C como la TS, la DHFR, la GARFT y la AICARFT, dando lugar a un efecto citotóxico sobre células tumorales. Su principal diana es la TS, asociada con el proceso de replicación del DNA y con el crecimiento celular. Algunos estudios sugieren que una baja expresión de TS predice la capacidad de respuesta al PMX en pacientes con NSCLC ¹⁴⁷. También se ha mostrado la capacidad del PMX de inducir la activación de las caspasas y provocar la apoptosis en líneas celulares de NSCLC ¹⁴⁰. Al igual que el MTX, PMX se poliglutamila por acción de la FPGS ^{151,152}, pero el estudio de la actividad de la FPGS no es un marcador útil para evaluar la respuesta al PMX ¹⁵³.

Entre los mecanismos de resistencia a los antifolatos se encuentran: mutaciones en el gen *SLC19A1*, la sobreexpresión de *DHFR* o mutaciones de ganancia de función en este gen, así como la falta de poliglutamilación del MTX ¹⁴². La incapacidad de retener el MTX intracelular se ha asociado también con un incremento en la expresión de los transportadores de eflujo de tipo ABC, con la pérdida de actividad de FPGS y con una elevada actividad de GGH ^{154,155}.

Enfermedades inflamatorias inmunomediadas

Las enfermedades inflamatorias inmunomediadas (EIMI) son un conjunto de patologías multifactoriales incurables que responden a dos componentes imprescindibles para su establecimiento y desarrollo ¹⁵⁶: por un lado, un componente inflamatorio crónico, que da lugar a la aparición de síntomas persistentes en el tiempo; y, por otro lado, un componente inmune debido a alteraciones en la respuesta inmunitaria. Entre las enfermedades que cumplen con estas características encontramos: la artritis reumatoide (RA), el lupus eritematoso sistémico (SLE), la espondiloartritis (SpA), la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) o el mieloma múltiple (MM) ¹⁵⁷. En la población occidental, la prevalencia de las EIMI oscila entre un 5%-7% ¹⁵⁸. Más concretamente, la prevalencia de RA en España se encuentra en torno a un 0,2%-1,1% ¹⁵⁹, siendo mayor en mujeres que en hombres en una relación 3:1 ¹⁶⁰.

Artritis Reumatoide (RA)

La RA es una enfermedad autoinmune, sistémica e inflamatoria crónica que cursa con afectación en las articulaciones, y que puede aparecer a cualquier edad, con una mayor incidencia en la población mayor de 40 años ¹⁶¹. La principal manifestación clínica consiste en la aparición de una inflamación crónica en la membrana sinovial (conocida como sinovitis), que restringe la movilidad y funcionalidad articular ¹⁶². La membrana sinovial es un tipo de tejido conjuntivo especializado que forma parte de la estructura de las articulaciones, cuya función principal es permitir la locomoción. Se trata de una membrana delgada situada entre la cavidad articular y la cápsula articular, y está constituida por dos capas: la íntima (o capa sinovial) y la subíntima. La capa íntima de la membrana sinovial sana está formada por una capa discontinua de uno a tres estratos de células, semipermeable al paso de determinadas moléculas y células. Las células presentes en esta capa son los TRMs y los fibroblastos. En la capa subíntima también encontramos fibroblastos y TRMs, estos últimos con un fenotipo diferente a los de la capa íntima, ya que no expresan CD16, lo que los hace menos fagocíticos y citotóxicos. También están presentes en esta capa adipocitos, vasos sanguíneos y linfáticos y células inflamatorias ¹⁶³. En la sinovitis debida a la RA se detecta una marcada hipertrofia de la membrana sinovial, caracterizada por la generación de nuevos vasos, por una elevada proliferación de fibroblastos, y por un incremento sustancial en la proporción de macrófagos (de un 10-20% a un 80%) derivados, en su mayoría, del reclutamiento de monocitos sanguíneos ¹⁶³⁻¹⁶⁵, así como por un aumento de otros tipos celulares como linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos B, neutrófilos y células dendríticas (**Fig. 6**), lo que modifica la composición celular de la membrana y del líquido sinovial. El líquido sinovial, localizado en el interior de la cavidad

articular se encarga de nutrir a los condrocitos del tejido cartilaginoso presente en las articulaciones, así como de lubricar dicha cavidad para evitar lesiones derivadas de los movimientos articulares. El cambio en la composición del líquido sinovial debido a la inflamación altera diferentes funciones celulares que afectan a la respuesta inflamatoria y aumentan la angiogénesis ¹⁶³. El proceso inflamatorio crónico también afecta a los tejidos adyacentes, dando lugar a un daño progresivo e irreversible del hueso y cartílago, y de los tendones y ligamentos ¹⁶¹.

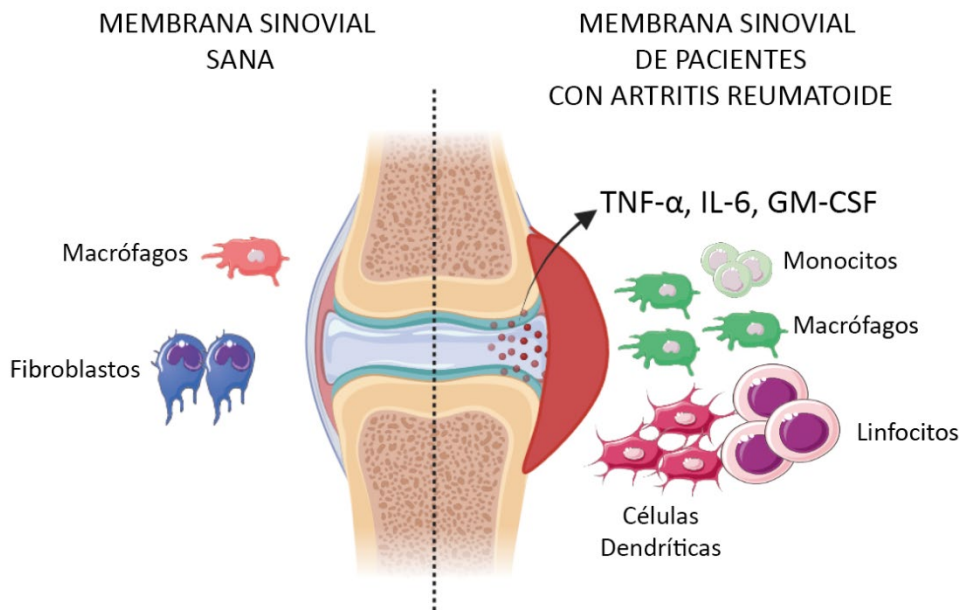


Figura 6. Esquema simplificado de las poblaciones celulares presentes en la membrana sinovial sana y de pacientes con RA. En la membrana sinovial sana, los macrófagos y fibroblastos representan la población mayoritaria de células. Durante el desarrollo de la RA, la membrana sinovial se engrosa debido a la infiltración de células del sistema inmunitario (como monocitos, células dendríticas o linfocitos) y a una proliferación de fibroblastos que contribuyen al proceso inflamatorio crónico mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 y GM-CSF) entre otros mediadores. Creada parcialmente con BioRender.com.

La predisposición genética juega un papel clave en la patogénesis de la RA, ya que familiares de primer grado de pacientes con RA tienen de dos a cinco veces mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad que la población general ¹⁶⁶. El principal gen asociado con la patogenia de la RA es *HLA-DRB1*, cuya forma proteica presenta una secuencia específica de cinco aminoácidos localizada entre los residuos 70-74 de la cadena β de la proteína (conocida como región del epítipo compartido, HLA-SE). Otros genes asociados con la RA, en menor medida, son *PTPN22*, *CTLA4* y *PADI4* ¹⁶¹.

La RA comienza a establecerse años antes de su manifestación clínica, debido a la presencia de autoanticuerpos, citoquinas, quimioquinas y cambios metabólicos que inician el programa inflamatorio ¹⁶⁷. Los principales autoanticuerpos se producen frente a proteínas citrulinadas (ACPAs) ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹, y frente al fragmento constante (Fc) de inmunoglobulinas propias (factor reumatoide, RF) ¹⁷⁰. Los ACPAs son importantes para orientar el diagnóstico, ya que su presencia ha sido asociada con la progresión radiológica

de la enfermedad, las manifestaciones extraarticulares y la respuesta al tratamiento. No todos los diagnósticos iniciales de RA presentan estos autoanticuerpos, pero pueden desarrollarlos conforme avanza la enfermedad. Esto ha dado lugar a una clasificación de pacientes en base a la presencia (RA seropositiva) o ausencia (RA seronegativa) de autoanticuerpos en sangre ¹⁶¹. La RA seropositiva está presente en dos de cada tres pacientes diagnosticados de RA ^{171,172}. Sin embargo, un estudio reciente ha mostrado un incremento en la incidencia de la RA seronegativa para RF en las últimas décadas ¹⁷³.

Mientras que la RA seropositiva está bien caracterizada, gran parte de la etiología de la RA seronegativa sigue siendo desconocida. La RA seronegativa presenta una mayor cantidad de articulaciones dolorosas en el momento del diagnóstico y una duración de los síntomas más corta que la RA seropositiva. Los factores ambientales y genéticos, así como la disfunción de las células del sistema inmunitario innato y adaptativo contribuyen a la patogénesis de ambos tipos de RA, por lo que la identificación de marcadores propios de la RA seronegativa son necesarios para orientar el tratamiento. Actualmente se han encontrado autoanticuerpos dirigidos frente a modificaciones postraduccionales y antígenos no modificados, como antiproteínas carbamoiladas (anti-CarP), anti-PTX3 y anti-DUSP-11, que pueden explicar la patogénesis de las RA seronegativas ¹⁷⁴.

Patogénesis de la RA

La etiopatogenia en RA seropositiva comienza cuando las células dendríticas reconocen a las proteínas citrulinadas, tras lo que se activan y maduran. Entonces, inician la respuesta inmunitaria al activar la proliferación y diferenciación de los linfocitos Th y de los Treg. Los linfocitos Th (CD4⁺ y CD8⁺) iniciarán el proceso de activación y diferenciación de los linfocitos B, que comenzarán con la producción de ACPAs ¹⁷⁵. Los MDMs reclutados aumentan el número de macrófagos en la membrana sinovial y producen numerosas citoquinas proinflamatorias, como el VEGF, el GM-CSF, la IL-6, la IL-1 β , la IL-17 y el TNF- α , que promueven la angiogénesis y la activación de las células mononucleares que se infiltran a la membrana sinovial, favoreciendo la cronificación del proceso inflamatorio ^{176,177}. El aumento en el número de macrófagos se ha correlacionado con una mayor severidad de la RA ¹⁷⁸. Interesantemente, aquellos pacientes que alcanzan el estado de remisión clínica se caracterizan por un aumento de la presencia de TRMs de perfil homeostático, y una disminución en el número de MDMs ^{165,179}. La remisión completa de la enfermedad es un hito que aún no se ha conseguido ya que la aparición de recaídas es bastante probable (50% tras un año del cese del tratamiento), incluso después de recuperar la homeostasis en el tejido ^{180,181}. En este sentido, aquellos pacientes en remisión, seropositivos para ACPA y RF, tienen una mayor probabilidad de recaídas ^{182,183} y la pérdida completa de estos autoanticuerpos es poco común ¹⁸⁴. Algunos autores sugieren que los macrófagos residentes de tejido, así como sus precursores de vida media larga, pueden adquirir marcas epigenéticas (metilaciones del DNA o acetilaciones de histonas) ligadas al proceso inflamatorio que no permiten la remisión completa de la enfermedad ^{185,186}.

Las subpoblaciones de macrófagos en la membrana sinovial sana y en RA

Estudios recientes empleando secuenciación de RNA de célula única por *single cell* (scRNA-seq) del tejido sinovial de pacientes con RA, en comparación al tejido sinovial de sujetos sanos o en remisión, han revelado la gran heterogeneidad fenotípica y funcional de la población de células mieloides, principalmente macrófagos, desde los estadios preclínicos y durante el desarrollo de la patología^{165,187}. Destacan los estudios realizados por *Culemann et al.*¹⁸⁶, *Alivernini et al.*¹⁶⁵, y *Edalat et al.*¹⁸⁸. En el trabajo de *Culemann et al.*, describen dos subpoblaciones de macrófagos sinoviales: macrófagos CX3CR1^{pos} localizados en la capa íntima, con función antiinflamatoria, y macrófagos CX3CR1^{neg} intersticiales. Mientras que en el trabajo de *Edalat et al.*, se describen dos grupos principales de macrófagos sinoviales: C1QA/B/C^{pos}FOLR2^{pos}CCR2^{neg}, con función antiinflamatoria, y C1QA/B/C^{neg}FOLR2^{neg}CCR2^{pos}, con función proinflamatoria.

Concretamente, el estudio de scRNA-seq realizado por *Alivernini et al.*¹⁶⁵ (**Fig. 7**), que compara macrófagos de tejido sinovial (STMs) de pacientes con RA activa, de pacientes en remisión y de individuos sanos, ha identificado que en la membrana sinovial existen nueve grupos fenotípicos de STMs, clasificados en dos grupos principales según la expresión de los marcadores MerTK y CD206: los macrófagos MerTK^{pos}CD206^{pos} localizados en la membrana sinovial de pacientes en remisión o población sana, y los macrófagos MerTK^{neg}CD206^{neg} que derivan de monocitos extravasados a la membrana sinovial de pacientes con RA (**Tabla 1**). Los macrófagos MerTK^{pos}CD206^{pos} se subdividen en las subpoblaciones de STMs TREM2^{pos} (1 y 2) y FOLR2^{high}TREM2^{neg} (3-5). La subpoblación TREM2^{pos} (1 y 2) se localiza en la capa íntima, donde los TREM2^{high} (1) presentan un perfil homeostático, mientras que los TREM2^{low} (2) muestran un perfil proinflamatorio. Por su parte, la subpoblación FOLR2^{high}TREM2^{neg} (3-5) reside en la capa subíntima, donde los LYVE1^{pos} (5) e ID2^{pos} (4) presentan un perfil homeostático y los ICAM1^{pos} (3) un perfil proinflamatorio¹⁸⁹.

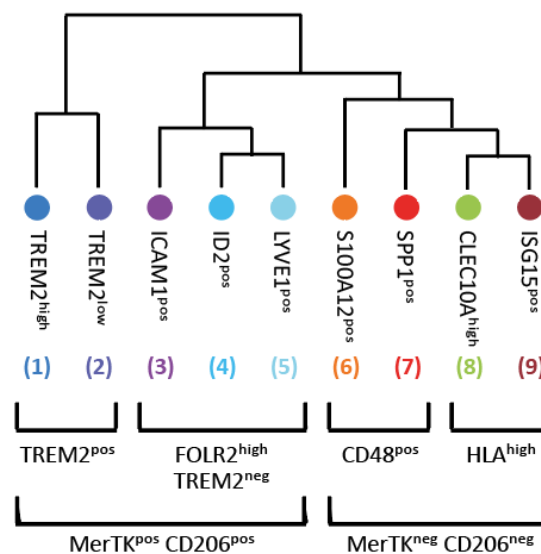


Figura 7. Esquema representativo de los fenotipos de STMs identificados por *Alivernini et al.*, y clasificación de subpoblaciones propuesta. Adaptada de¹⁶⁵.

Tabla 1. Clasificación, localización y tejido de las subpoblaciones de macrófagos propuestas por *Alivernini et al.* Adaptada de ¹⁶⁵.

| Población | Subpoblación | Fenotipos | Localización | Tejido |
|--|--|-----------------------------|----------------|--|
| MerTK ^{pos} CD206 ^{pos} | TREM2 ^{pos} | (1) TREM2 ^{high} | Capa íntima | MEMBRANA SINOVIOL SANA |
| | | (2) TREM2 ^{low} | | |
| | FOLR2 ^{high} TREM2 ^{neg} | (3) ICAM1 ^{pos} | Capa subíntima | |
| | | (4) ID2 ^{pos} | | |
| | | (5) LYVE1 ^{pos} | | |
| MerTK ^{neg} CD206 ^{neg} | CD48 ^{pos} | (6) S100A12 ^{pos} | | MEMBRANA SINOVIOL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE |
| | | (7) SPP1 ^{pos} | | |
| | HLA ^{high} | (8) CLEC10A ^{high} | | |
| | | (9) ISG15 ^{pos} | | |

Cuando tiene lugar un proceso inflamatorio, no solamente se diferencian las subpoblaciones de STMs TREM2^{pos} y FOLR2^{high}TREM2^{neg} hacia un estado más proinflamatorio (TREM2^{low}, 2; e ICAM1^{pos}, 3), sino que también se activa la diferenciación de monocitos infiltrados al tejido sinovial hacia macrófagos de perfil proinflamatorio (MerTK^{neg}CD206^{neg}) ¹⁸⁹. Los macrófagos MerTK^{neg}CD206^{neg} se subdividen en las subpoblaciones CD48^{pos} (6 y 7) y HLA^{high} (8 y 9). La subpoblación CD48^{pos} se infiltra en la capa subíntima de la membrana sinovial y se diferencia en los S100A12^{pos} (6), cuya función es producir alarminas, para activar a monocitos y fibroblastos, y CXCL8, para reclutar neutrófilos ¹⁶⁵; y en los SPP1^{pos} (7), cuya función principal es participar en la activación de la resorción ósea ¹⁹⁰ y en la diferenciación de neutrófilos proinflamatorios ¹⁹¹. Por otro lado, la subpoblación HLA^{high} también se localizada en la capa subíntima y se diferencia en los ISG15^{pos} (8), cuya función es producir IFN de tipo I que contribuye a la cascada proinflamatoria y parece ser la causante de la baja respuesta al tratamiento en algunos pacientes ¹⁹²; y en los CLEC10A^{pos} (9), que presentan un fenotipo similar al de las células dendríticas, con función presentadora de antígeno ^{165,189}.

Los autores de este estudio también muestran que los macrófagos MerTK^{neg}CD206^{neg} de pacientes con RA activa producen una mayor concentración de GM-CSF en respuesta a LPS, que los macrófagos MerTK^{pos}CD206^{pos} de pacientes con RA en remisión ¹⁶⁵. Un amplio número de citoquinas proinflamatorias activadoras de la señalización JAK/STAT, entre las que se encuentra el GM-CSF, están elevadas ¹⁹³⁻¹⁹⁵, y la sobreactivación de la ruta contribuye a la patogénesis molecular de las artritis inflamatorias ¹⁹⁶.

La señalización por las Janus quinasas (JAK) y las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT)

La ruta JAK/STAT es importante para la señalización no solo del receptor de GM-CSF, sino de todos miembros de la familia de los receptores de citoquinas de tipo I y II (**Fig. 8**), que regulan funciones tan importantes como la hematopoyesis, la respuesta inmunitaria, la inflamación, la apoptosis y la adipogénesis ¹⁹⁷. En primer lugar, se describió a la familia de factores de transcripción STAT (**Tabla 2**): STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6 ¹⁹⁸⁻²⁰⁰, y a su vez, fueron describiéndose los miembros que forman parte de la familia JAK ²⁰¹⁻²⁰³. Otros trabajos establecieron la relación entre los JAK y los STAT: primero durante el estudio de la señalización del IFN- α/β a través de TYK2 ²⁰⁴ y, más tarde, se demostró que para la fosforilación de los factores de transcripción STAT es necesaria la activación de los JAK dependiente de la señalización por IFN ²⁰⁵.

La familia JAK está compuesta por cuatro miembros (**Tabla 3**): JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Son enzimas tirosina quinasa citosólicas asociadas a receptores de citoquinas localizados en la membrana. JAK3 se expresa exclusivamente en células del sistema linfático y médula ósea, y en células endoteliales y del músculo liso ^{206,207}. Los otros miembros se expresan de manera ubicua en la mayoría de los tejidos ^{202,208,209}. Los JAKs están formados por siete dominios de homología, denominados JH: JH1 está compuesto aproximadamente por 250 aminoácidos, y codifica para la estructura proteína quinasa que fosforila específicamente a sus sustratos; JH2 es un dominio estructuralmente similar al JH1, pero sin la función quinasa, por eso es conocido como el dominio pseudoquinasa, y su función es regular la actividad del dominio JH1; JH3 y la mitad del JH4 forman el dominio de homología Src 2 (SH2); la otra mitad del JH4, junto al JH5, JH6 y JH7 forman el dominio FERM que, junto al dominio SH2, regula la unión de los JAK a sus receptores de membrana ^{196,202,210}. Para su actividad, es necesario que los JAK formen homodímeros (como el JAK2/JAK2 asociado a IL-3R) o heterodímeros (como el JAK1/JAK2 o el JAK1/TYK2 asociado a los receptores de IFNs) ²¹¹. La cascada de señalización JAK/STAT puede seguir dos rutas de activación: la vía canónica y la no canónica.

| Tabla 2. Familia STAT: citoquinas y factores de crecimiento asociados, y sus funciones. Adaptada de ¹⁹⁶ | | |
|---|---|--|
| STAT | Citoquinas y factores de crecimiento | Funciones biológicas |
| STAT1 | Todos los interferones, IL-2, IL-6, PDGF, EGF, HGF, TNF, angiotensina II | (1) Regulación del crecimiento celular y la diferenciación (2) Promoción de la apoptosis (3) Inhibición de la ocurrencia tumoral (4) Regulación de la respuesta inmunitaria |
| STAT2 | Interferones de tipo I | (1) Respuesta antiviral |
| STAT3 | Familia de la IL-6 (IL-6, IL-11, IL-31, LIF, CNTF, CT-1, OSM, CLCF1), Familia de la IL-10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26), IL-21, IL-27, G-CSF, Leptina e interferones de tipo I | (1) Regulación de la respuesta Th17 (2) Regulación del crecimiento, diferenciación y apoptosis celular (3) Regulación de la ocurrencia tumoral (promoción e inhibición) |
| STAT4 | Interferones de tipo I, IL-12 e IL-23 | (1) Regulación del desarrollo, diferenciación y función de los Th1 |
| STAT5a, STAT5b | Prolactina, Familia de la IL-2 (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15), IL-3, IL-5, EGF, EPO, GM-CSF, TPO, GH y PDGF | (1) Regulación del crecimiento, diferenciación y apoptosis celular (2) Regulación de la producción de células inmunitarias (3) Asociado con la progresión tumoral |
| STAT6 | IL-4 e IL-13 | (1) Regulación de la diferenciación de los Th2 (2) Regulación de la conversión entre isotipos de inmunoglobulinas (3) Promoción de la proliferación y maduración de linfocitos B e inducción de la expresión de MHC-II e IgE |

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; EGF: factor de crecimiento epidérmico; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; LIF: factor inhibidor de la leucemia; CNTF: factor neurotrófico ciliar; CT-1: cardiotrofina 1; OSM: oncostatina M; CLCF1: cardiotrofina similar a la citoquina 1; G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos; EPO: eritropoyetina; TPO: trombopoyetina; GH: hormona de crecimiento; NK: *natural killer*.

Tabla 3. Características y funciones de los miembros de la familia JAK. Adaptada de ^{196,211,212}.

| JAKs | Tejido | Receptor asociado | Dianas | Función |
|------|---|---|-------------------|--|
| JAK1 | Ampliamente expresado en todos los tejidos | (1) Familia de receptores que poseen la cadena y común (IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R, IL-21R) (2) Receptores de citoquinas de tipo II (IFNs-R, familia del receptor de la IL-10 e IL-13R) (3) Receptores con la subunidad gp130 (IL-6R, IL-11R, CNTF-R, OSM-R, LIF-R, CT-1R) (4) Receptor del TSLP | Todos los STATs | (1) Proliferación, supervivencia, activación y diferenciación de linfocitos (2) Respuesta antiviral, defensa epitelial y regulación de la respuesta inmunitaria (3) Estimulación de linfocitos B e inducción de reactantes de fase aguda hepáticos (4) Promoción de la respuesta inmunitaria tipo Th2 |
| JAK2 | Ampliamente expresado en todos los tejidos | (1) Receptores con la subunidad gp130 (2) Receptor del IFN tipo II (IFN γ R) (3) Familia del receptor de la IL-3 (IL-3R, IL-5R y receptor del GM-CSF) (4) Receptores de cadena única o de hormonas (GH-R, EPO-R, TPO-R, PRL-R y G-CSFR) (5) Receptor del TSLP (6) Receptores de la familia de la IL-12 (IL-12R, IL-23R) | STAT1, 2, 3, 4, 5 | (1) Estimulación de linfocitos B e inducción de reactantes de fase aguda hepáticos (2) Promoción de la fagocitosis, de la eliminación de patógenos intracelulares y de propiedades antitumorales (3) Regulación del crecimiento, de la diferenciación, de la migración y de las funciones hematopoyéticas (4) Regulación hormonal (5) Promoción de la respuesta inmunitaria tipo Th2 (6) Activación de linfocitos T y NK, y de macrófagos en la respuesta autoinmunitaria |
| JAK3 | Tejidos linfoides, médula ósea, y células endoteliales y del músculo liso | (1) Familia de receptores que poseen la cadena y común | STAT1, 3, 5, 6 | (1) Proliferación, supervivencia, activación y diferenciación de linfocitos |
| TYK2 | Ampliamente expresado en todos los tejidos | (1) Receptores con la subunidad gp130 (2) Receptores de la familia de la IL-12 (3) Receptores de citoquinas de tipo II (menos el receptor de IFN de tipo II) | STAT1, 2, 3, 4, 5 | (1) Estimulación de linfocitos B e inducción de reactantes de fase aguda hepáticos (2) Activación de linfocitos T y NK, y de macrófagos en la respuesta autoinmunitaria (3) Respuesta antiviral, defensa epitelial y regulación de la respuesta inmunitaria |

CNTF-R: receptor del factor neurotrófico ciliar; OSM-R: receptor de la oncostatina M; LIF-R: receptor del factor inhibidor de la leucemia; GH-R: receptor de la hormona del crecimiento; EPO-R: receptor de la eritropoyetina; TPO-R: receptor de la trombopoyetina; PRL-R: receptor de la prolactina; G-CSFR: receptor del G-CSF; TSLP: linfopoyetina estromal tímica

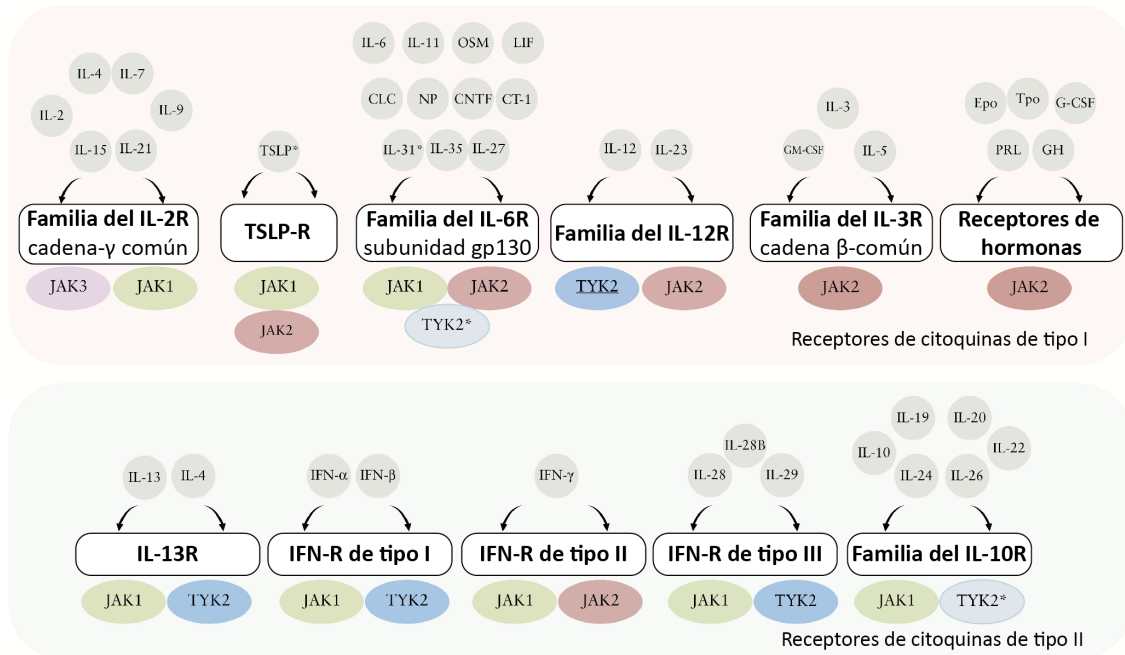


Figura 8. Familia de receptores de citoquinas de tipo I y de tipo II. Todos los receptores señalizan a través de homodímeros o heterodímeros de la familia JAK. *TYK2 puede tener un papel importante en la señalización de algunos receptores (azul oscuro) o funcionar como proteína de anclaje en otros (azul claro). *IL-31 no señaliza a través de gp130, sino que lo hace a través de la subunidad β del OSM-R, que pertenece a la familia del IL-6R. Adaptada de ²¹¹.

La vía canónica comienza con la unión del ligando específico al receptor de membrana asociado con el homo o heterodímero de JAK, el cual dimeriza. Algunos receptores, como el de la IL-10 ²¹³, el receptor 1 del TNF (TNF-R1) ²¹⁴ o el receptor de la eritropoyetina (EPO-R) ^{215,216}, pueden preformar dímeros inactivos antes de la unión del ligando para facilitar y agilizar el proceso de transducción de señales. De cualquier manera, la unión ligando-receptor promueve la fosforilación de los dominios JH1 de los JAKs en residuos de tirosina conservados (Tyr1038/1039 en JAK1, Tyr1007/1008 en JAK2, Tyr980/981 en JAK3 y Tyr1054/1055 en TYK2), permitiendo así la posterior fosforilación de los residuos de Tyr que servirán de sitios de anclaje para los STATs ¹⁹⁶. Tras la unión a estos sitios de anclaje, los STATs son fosforilados (Tyr701 en STAT1, Tyr690 en STAT2, Tyr705 en STAT3, Tyr693 en STAT4, Tyr694 en STAT5a, Tyr699 en STAT5b y Tyr641 en STAT6), momento en el que se disocian del receptor y forman homo o heterodímeros a través de interacciones entre los dominios SH2 y los residuos de fosfotirosina. Los dímeros de STAT recién formados se translocan al núcleo y se dirigen hacia las regiones promotoras de sus genes diana, regulando su transcripción ^{217,218}. Esta regulación puede llevarse a cabo a través de diversos mecanismos: unión directa de los STATs a sus sitios diana en el DNA para activar la transcripción; formación de un complejo de transcripción mediante la unión entre STATs y otros factores de transcripción para activar la transcripción mediada por STATs; unión con elementos de unión al DNA diferentes a los STATs para promover la transcripción dependiente de los STATs; y, por último, mediante la unión de los STATs y otros factores de transcripción a regiones del DNA independientes que activan la transcripción de manera sinérgica ¹⁹⁶.

En cambio, la vía no canónica es algo más compleja y está relacionada con otras funciones ajenas a la activación transcripcional de sus genes diana. Por ejemplo, todos los STATs, menos STAT4, pueden localizarse en la mitocondria y promover la fosforilación oxidativa y la permeabilidad de la membrana; y STAT3 puede localizarse en el retículo endoplásmico y participar en la resistencia a la apoptosis mediada por el estrés oxidativo ²¹⁹. Es importante mencionar que los STATs pueden activarse por otras quinasas similares a JAK o por receptores no asociados a JAK. Un ejemplo es la activación constitutiva de STAT3 mediada por la tirosina quinasa c-Src, la cual podría contribuir a un aumento de la expresión de genes asociados a tumores ²²⁰.

Para regular la actividad de la ruta JAK/STAT existen mecanismos tanto de regulación positiva como negativa. Para la regulación positiva, esta ruta se sirve de sus interacciones con otras rutas de señalización para potenciar o coestimular su activación como, por ejemplo, la formación del complejo STAT5-receptor de glucocorticoides, para mejorar la actividad transcripcional de STAT5 ²²¹; o la activación de STAT1 α mediada por la proteína de unión a CREB (CBP) y p300 ²²². La regulación negativa se sirve de tres principales reguladores: la familia de proteínas SOCS/CISH, la familia de proteínas inhibitoras de STATs activados (PIAS) y las proteínas tirosina fosfatasa (PTPs) ¹⁹⁶. El mecanismo de regulación negativa mediada por las PTP, como su propio nombre indica, consiste en eliminar las marcas de fosfato añadidas sobre los residuos de tirosina. Esto implica tanto a las tirosinas fosforiladas de los JAKs y sus receptores asociados, como a las de los STATs. Uno de los miembros importantes de esta familia es la proteína tirosina 1 que contiene el dominio SH2 (SHP-1), implicada en la desfosforilación de STAT5b tras ser activada por la hormona del crecimiento (GH) ²²³.

La ruta de señalización JAK/STAT está muy conservada y su desregulación se ha visto asociada con el desarrollo de diversas patologías. La aparición de mutaciones que sobreexpresan a los miembros de la familia JAK y/o de la familia STAT están relacionados con la aparición de tumores o con el agravamiento de enfermedades inflamatorias inmunomediadas, como la RA y el SLE ¹⁹⁶. También juegan un papel clave la presencia de polimorfismos. En el SLE se ha identificado un polimorfismo en TYK2 ²²⁴, y en la RA se han identificado polimorfismos para STAT4 y STAT6 ^{225,226}. Además, en la RA también se han encontrado mutaciones como la variante de JAK2 (V617F), asociada con las neoplasias mieloproliferativas ²²⁷, y otras variantes (Y640F y D661Y) que aumentan la expresión de STAT3 ²²⁸.

El conocimiento sobre las rutas de señalización implicadas en la RA y sobre los principales actores que participan en su establecimiento y progresión, ha permitido el desarrollo de numerosos fármacos para su tratamiento ¹⁶⁸.

Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad

Los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs) pertenecen a la terapia inmunosupresora e inmunomoduladora empleada en el espectro de la artritis inflamatoria y tienen como objetivo reducir los síntomas derivados del proceso inflamatorio en las articulaciones de los pacientes ¹⁶⁸. Se pueden clasificar en sintéticos, convencionales (csDMARDs), sintéticos dirigidos (tsDMARDs) y biológicos (bDMARDs) ²²⁹.

Entre los csDMARDs se encuentran el antagonista del folato metotrexato (MTX)^{230,231}, la hidroxicloroquina²³², la sulfasalazina^{233,234} y la leflunomida²³⁵. Todos comparten su capacidad para generar un ambiente antiinflamatorio inhibiendo o bloqueando la activación de células del sistema inmunitario, así como la transcripción de genes de citoquinas proinflamatorias. El más utilizado es el MTX debido a su probada eficacia para el tratamiento de la RA, así como por su perfil de seguridad y su bajo coste²³⁶.

Los tsDMARDs son una nueva clase de fármacos que tienen como diana terapéutica las enzimas implicadas en etapas importantes de la señalización de la respuesta inflamatoria, sobre todo, de las rutas implicadas en la señalización mediada por citoquinas²³⁷. De importante mención aquí son los inhibidores de las Janus quinasas (JAKi), los inhibidores de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) y los inhibidores de la ruta de NF- κ B²³⁸⁻²⁴⁰.

Por último, los bDMARDs son fármacos que bloquean la propia función estimuladora de las citoquinas, bien uniéndose directamente a ellas o a sus receptores, mediante el empleo de anticuerpos específicos. También encontramos fármacos dirigidos frente a moléculas características del proceso de maduración de las células inmunitarias como el CD20^{229,241}. Actualmente, existen inhibidores del TNF- α ²⁴², del IL-6R^{229,243} y de la IL-6²⁴³. Hay que destacar el desarrollo de fármacos anti-GM-CSF y anti-GM-CSFR, ya que el eje GM-CSF/GM-CSFR está implicado de manera directa en la patogénesis de la RA. Mavrilimumab es el primer anti-GM-CSFR que ha superado con éxito ensayos clínicos de fase II de pacientes con RA. Los anti-GM-CSF, otilimab, lenzilumab, namilumab, TJM2 y MORAb-022, están siendo ensayados por diferentes compañías para el tratamiento de la RA, de la esclerosis múltiple, de la osteoartritis, del asma, de la psoriasis y de la COVID-19^{35,55}. Todos mostraron un perfil de seguridad y eficacia adecuado en ensayos clínicos de fase II de pacientes con RA, aunque MORAb-022 solo ha completado un ensayo de fase I (resultados no publicados) y TJM2 está comenzando el reclutamiento de pacientes para un ensayo de fase I.

Metotrexato en RA

La *European Alliance of Associations for Rheumatology* (EULAR) recomienda el empleo de metotrexato (MTX, 5-25 mg/semana) como terapia inicial en pacientes con RA de reciente comienzo que no muestran factores de mal pronóstico²⁴⁴ (**Fig. 9**). A pesar de que la dosis de MTX es relativamente baja para que ejerza efectos tóxicos, se combina el tratamiento con ácido fólico (5-10 mg) o con su análogo sintético, ácido folínico (5 mg), 24h después. Desde hace tiempo se conoce que los antagonistas del folato tienen un potencial farmacológico para el tratamiento de la RA²⁴⁵.

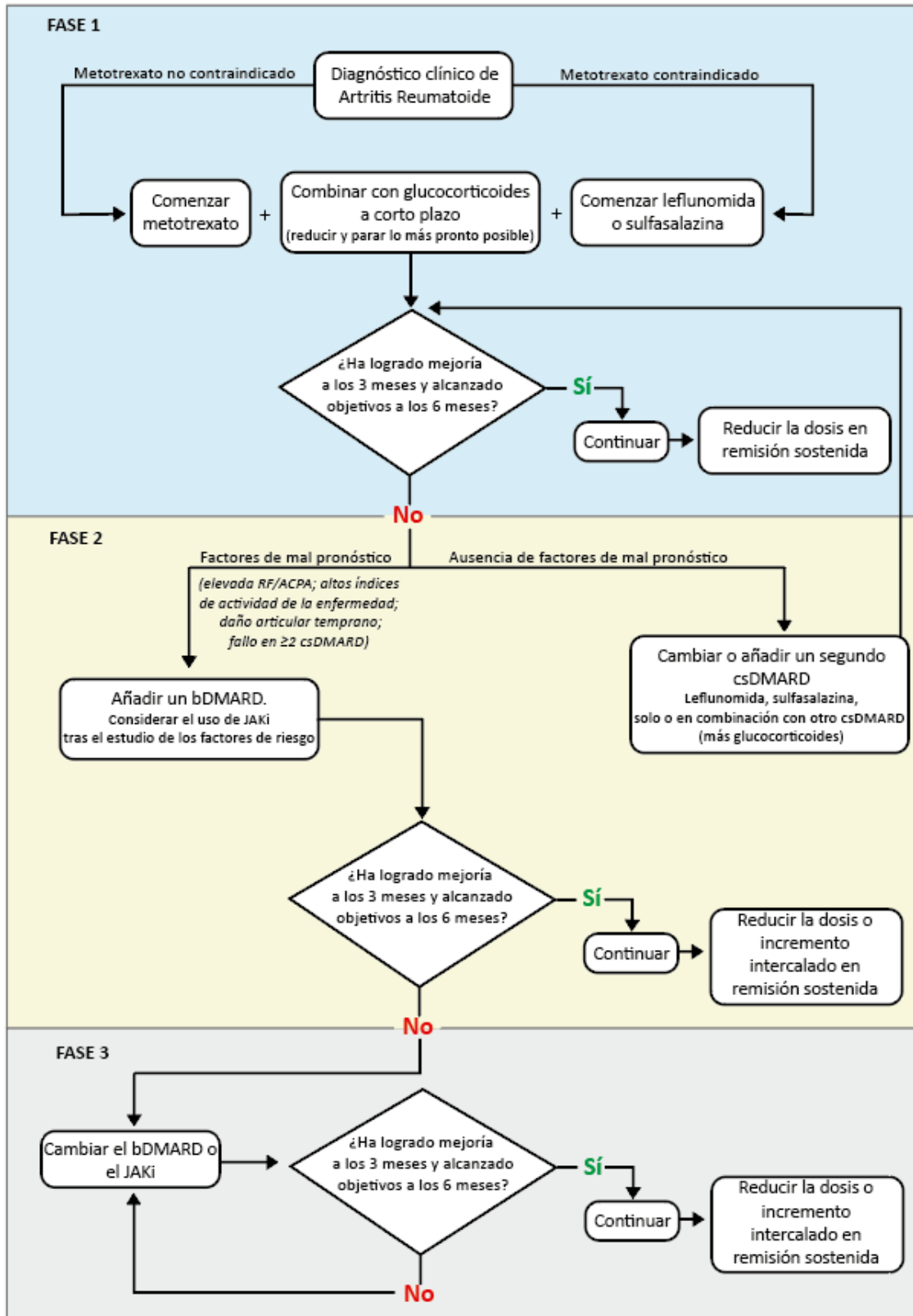


Figura 9. Diagrama de flujo que representa el algoritmo actual (2022) de toma de decisiones para el control de los pacientes diagnosticados de RA según EULAR. Adaptada de ²⁴⁴.

La generación de resistencias al tratamiento con MTX y/o la falta de respuesta de los pacientes a esta terapia, dio lugar a la síntesis de los bDMARDs como el adalimumab (anti-TNF), el rituximab (anti-CD20), el tocilizumab (anti-IL-6R) o el sarilumab (anti-IL6), los cuáles muestran como limitación ser tratamientos invasivos, pues precisan de ser inyectados en centros sanitarios. Actualmente, dadas las limitaciones de los csDMARDs y los bDMARDs, está siendo muy estudiado el tratamiento con JAKi^{244,246}, tsDMARDs de segunda y tercera línea de tratamiento que son objeto de estudio en esta tesis doctoral.

Inhibidores de las Janus quinasas (JAKi)

Los JAKi son un grupo de fármacos sintéticos orales que, de forma general, inhiben competitivamente la unión de ATP (**Fig. 10**) a los residuos de tirosina específicos para la activación de los miembros de la familia JAK¹⁹⁶. Están implicados en el bloqueo de la señal de numerosas citoquinas y factores de crecimiento que señalizan a través del eje JAK/STAT (**Fig. 8**) y que regulan funciones tan importantes como la hematopoyesis, la inflamación o la respuesta antiviral¹⁹⁷. Se pueden dividir en dos generaciones: la primera generación incluye aquellos JAKi (como el tofacitinib o el baricitinib) que muestran una baja especificidad para miembros de la familia JAK; mientras que los de segunda generación incluyen aquellos JAKi (como el upadacitinib o el filgotinib) cuya síntesis proporciona estructuras orgánicas que los hacen más específicos para los miembros de la familia JAK que los de primera generación. También pueden clasificarse en función del tipo de inhibición que ejercen sobre sus dianas en inhibidores reversibles (competitivos y alostéricos) o irreversibles²⁴⁷. Dentro de los inhibidores reversibles competitivos podemos diferenciar los de tipo I y los de tipo II en base a su capacidad para unirse al dominio quinasa según la conformación que este adopta:

- Los de tipo I se unen al dominio quinasa en su conformación activa^{248,249}, y aquí se incluyen a tofacitinib, de primera generación, y a filgotinib y peficitinib, de segunda generación. Se cree que la capacidad que muestran los JAKi de tipo I para unirse de manera no selectiva a diferentes JAK es debido a que la región del dominio quinasa está altamente conservada entre los cuatro miembros de la familia²⁵⁰.
- Los de tipo II pueden unirse tanto a la conformación activa como a la inactiva del dominio quinasa^{248,249}. Aquí se incluyen los JAKi NVP-BBT594 y NVP-CHZ868, inhibidores de segunda generación específicos para JAK2, que actualmente se utilizan como drogas de uso exclusivo para investigación^{251,252}.

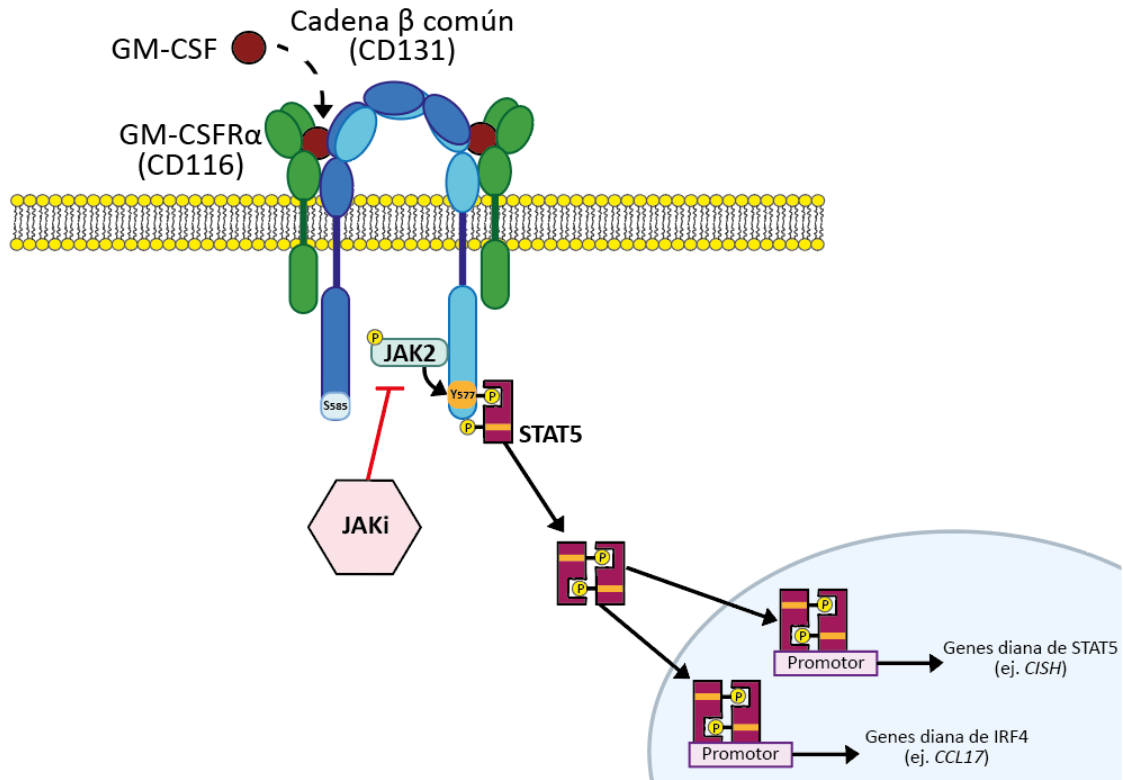


Figura 10. Mecanismo de acción de los JAKi sobre la señalización del eje GM-CSF-GM-CSFR. La mayoría de JAKi se unen de manera competitiva a los residuos de tirosina específicos, inhibiendo la fosforilación necesaria para la activación de los JAK. Adaptada de ⁸⁶.

Los inhibidores reversibles alostéricos van dirigidos a un sitio de unión alostérico, diferente del sitio de unión al ATP en los JAK ^{248,249}. El único JAKi alostérico aprobado actualmente para su uso en psoriasis es deucravacitinib, que está siendo evaluado en ensayos clínicos para el tratamiento de la artritis psoriásica, la alopecia areata, la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, el SLE y el lupus eritematoso cutáneo subagudo discoide. Deucravacitinib se une a la región reguladora JH2 pseudoquinasa, bloqueando la conformación del dominio quinasa JH1 en su forma inactiva. Debido a esto, parece que los efectos adversos más graves derivados del uso de los JAKi competitivos son más escasos ²⁵³.

El primer JAKi aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para su uso clínico fue ruxolitinib para el tratamiento de la mielofibrosis ²⁵⁴ y para la policitemia vera ²⁵⁵. A partir del estudio de las rutas inhibidas por los JAKi empezó a plantearse su utilización para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la RA, la psoriasis, la colitis ulcerosa, el SLE, la alopecia areata, entre otras ¹⁹⁶.

JAKi en RA

Para el tratamiento de la RA se han aprobado actualmente cinco JAKi por diferentes organismos reguladores de medicamentos y de la salud a lo largo del mundo: tofacitinib (Xeljanz®), baricitinib (Olumiant®), upadacitinib (Rinvoq®), filgotinib (Jyseleca®) y peficitinib (Smyraf®) ²⁵⁶ (**Tabla 4**). La EULAR recomienda el uso de los JAKi como segunda o tercera línea de tratamiento cuando ha fallado la terapia convencional con MTX o los bDMARDs ²⁴⁴ (**Fig. 9**).

El primer JAKi aprobado para el tratamiento de la RA fue tofacitinib (5 mg dos veces al día) en 2012 ²⁵⁷. Este fármaco es un inhibidor de todos los miembros de la familia JAK, mostrando una mayor selectividad por JAK3 (IC₅₀=1.1 nM). Baricitinib (2-4 mg diarios), JAKi aprobado para la RA en 2017, inhibe a todos los JAK y de manera más selectiva a JAK1/JAK2 (IC₅₀=4.0 nM e IC₅₀=6.6 nM, respectivamente) ²⁴⁷. Upadacitinib (15 mg/día) fue aprobado inicialmente para el tratamiento de la RA moderada-severa ²⁵⁸, y posteriormente para el tratamiento de la artritis psoriásica ²⁵⁹, dermatitis atópica ²⁶⁰ y para la colitis ulcerosa ²⁶¹. Se trata de un JAKi de segunda generación que muestra selectividad por JAK1 (IC₅₀=47nM), y en menor medida por JAK2 (IC₅₀=120 nM) ²⁴⁷. Todos los ensayos clínicos (*ORAL*, *RA* y *SELECT*) llevados a cabo para evaluar la seguridad y eficacia de estos tres JAKi mostraron una clara mejoría en los índices que miden la actividad de la enfermedad (ACR20, ACR50 y ACR70) a los tres y seis meses de comenzar el tratamiento frente a los pacientes tratados con placebo, con MTX o con un anti-TNF ²⁶²⁻²⁶⁵. Los resultados del ensayo *ORAL-SURVEILLANCE* mostraron que el empleo de tofacitinib en pacientes mayores de 65 años, con presencia de factores de riesgo, resultó en la aparición de efectos adversos graves, lo que ha llevado a reevaluar el perfil de seguridad de este JAKi y a considerar factores de riesgo en pacientes de avanzada edad ²⁴⁴. Sin embargo, diferentes ensayos clínicos en RA ²⁶⁶, psoriasis ²⁶⁷ y enfermedad inflamatoria intestinal ²⁶⁸ han mostrado un perfil riesgo-seguridad aceptable para tofacitinib.

Los JAKi bloquean tanto la acción de las citoquinas como la de su señalización. En el caso particular de la RA, las dosis empleadas de los distintos JAKi son capaces de inhibir la señalización de diversas citoquinas, lo que está relacionado con los posibles efectos adversos ^{266,269-272}. Los principales riesgos asociados al tratamiento con JAKi implican la aparición de infecciones, nefropatía, perforaciones gastrointestinales, eventos tromboembólicos, hematológicos y cardiovasculares, tumores y alteraciones del perfil lipídico. También se ha estudiado el potencial teratogénico de estos fármacos, así como su efecto sobre la fertilidad ²⁵⁶.

INTRODUCCIÓN

Tabla 4. JAKi aprobados para su uso en RA y otras enfermedades inflamatorias. Tipo de inhibición y dianas farmacológicas (IC₅₀)^{247,273}.

| | Inhibición | Dianas (IC ₅₀) | Enfermedad |
|-------------------------|-------------|--|---|
| Tofacitinib (Xeljanz®) | Competitiva | JAK1 (2,9 nM) JAK2 (1,2 nM) JAK3 (1,1 nM) | <ul style="list-style-type: none"> • <u>Artritis Reumatoide (2012)</u> • Artritis Psoriásica (2017) • Colitis Ulcerosa (2018) • Artritis Idiopática Juvenil (2020) • Espondilitis Anquilosante (2021) |
| Baricitinib (Olumiant®) | Competitiva | JAK1 (5,9 nM) JAK2 (5,7 nM) | <ul style="list-style-type: none"> • <u>Artritis Reumatoide (2017)</u> • COVID-19 (2020) • Uveítis asociada a Artritis Idiopática Juvenil (Fase 3, 2023) |
| Upadacitinib (Rinvoq®) | Competitiva | JAK1 (45 nM) JAK2 (109 nM) | <ul style="list-style-type: none"> • <u>Artritis Reumatoide (2019)</u> • Artritis Psoriásica (2021) • Dermatitis Atópica (2022) • Colitis Ulcerosa moderada-severa (2022) |
| Filgotinib (Jyseleca®) | Competitiva | JAK1 (10 nM) JAK2 (28 nM) | <ul style="list-style-type: none"> • <u>Artritis Reumatoide (2020)</u> |
| Peficitinib (Smyraf®) | Competitiva | JAK1 (3,9 nM) JAK2 (5 nM) JAK3 (0,7 nM) TYK2 (4,8 nM) | <ul style="list-style-type: none"> • <u>Artritis Reumatoide (2019)</u> |

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los estudios sobre macrófagos han mostrado su relevancia fisiopatológica en el establecimiento de enfermedades como el cáncer y la artritis reumatoide (RA), debido fundamentalmente a su plasticidad y a su capacidad para producir citoquinas que modulan la respuesta inflamatoria. En enfermedades inflamatorias inmunomediadas (EIMI), el MTX empleado a dosis bajas (LD-MTX) tiene efecto antiinflamatorio. Resultados previos de nuestro grupo han determinado el mecanismo molecular de la actividad antiinflamatoria de LD-MTX, que condiciona a los macrófagos hacia un estado tolerante, disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias inducidas por estímulos patogénicos sucesivos. Sin embargo, el MTX es un fármaco que históricamente ha sido utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer a dosis altas (HD-MTX) y su acción sobre macrófagos protumorales no se ha estudiado. Hipotetizamos que el empleo de HD-MTX en contexto tumoral podría ejercer un efecto reprogramador sobre macrófagos de perfil protumoral y sobre su diferenciación desde monocito. Por su parte, los JAKi son fármacos sintéticos dirigidos a las rutas de señalización iniciadas por numerosas citoquinas y hormonas implicadas en el proceso inflamatorio. Dada la selectividad de los JAKi por el eje JAK/STAT y dado que GM-CSF es una de las citoquinas que dirige el programa proinflamatorio en macrófagos vía JAK/STAT, proponemos que el empleo de los JAKi ejerce un efecto reprogramador sobre los macrófagos y sobre la diferenciación monocito-macrófago. El efecto reprogramador contemplaría cambios en la expresión de genes específicos y en las capacidades funcionales de los macrófagos, contribuyendo a modular la sinovitis y el proceso inflamatorio en artritis reumatoide.

De la presente hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo 1: Evaluar el efecto de dosis altas de metotrexato (HD-MTX) sobre macrófagos humanos derivados de monocitos (MDMs) en presencia de M-CSF.

Objetivo 1.1: Analizar el perfil transcripcional y funcional de los MDMs tratados con HD-MTX.

Objetivo 1.2: Identificar los mecanismos moleculares implicados en los efectos inducidos por HD-MTX sobre los MDMs.

Objetivo 2: Identificar el efecto de los inhibidores de JAK (JAKi) sobre macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de GM-CSF *in vitro*, así como sobre monocitos de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide *in vivo*.

Objetivo 2.1: Evaluar el efecto de los JAKi sobre la diferenciación de monocitos a macrófagos desde el punto de vista transcripcional, bioquímico y funcional.

Objetivo 2.2: Analizar la frecuencia de las subpoblaciones de monocitos de sangre periférica y el perfil transcripcional de monocitos CD14⁺ de sangre periférica en pacientes con RA pre y postratamiento con JAKi.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos empleados en esta tesis se encuentran recogidos en los artículos presentados en la misma.

RESULTADOS

Los resultados de esta tesis doctoral se encuentran recogidos en los artículos presentados en la misma.

PUBLICACIONES

La inhibición de GSK3 β previene la reprogramación por dosis altas de metotrexato en macrófagos

El metotrexato (MTX) es un fármaco antifolato utilizado como agente quimioterapéutico para la leucemia linfoblástica aguda, donde el MTX mejora el pronóstico de los pacientes. La reprogramación de macrófagos está siendo cada vez más estudiada como una estrategia terapéutica antitumoral. Sin embargo, aunque el MTX limita la acción patogénica de los macrófagos en enfermedades inflamatorias crónicas, sus efectos sobre los macrófagos que promueven tumores no han sido explorados previamente. Ahora informamos que el MTX moldea el perfil transcripcional y funcional de los macrófagos humanos dependientes de M-CSF, cuyo transcriptoma está altamente enriquecido con la firma génica que define a los macrófagos asociados a tumores patogénicos ("large TAM"). Específicamente, el MTX indujo la adquisición de la firma génica de los "small TAM" antitumorales y sesgó a los macrófagos hacia un fenotipo IL-6^{high} IFN β 1^{high} IL-10^{low} tras la estimulación subsecuente. Desde el punto de vista de la señalización, el efecto de reprogramación de macrófagos inducido por MTX se correlacionó con una reducción de la expresión y función del receptor de M-CSF CSF1R, así como con una disminución en la expresión de los factores de transcripción MAF y MAFB, determinantes principales de los macrófagos protumorales cuya actividad transcripcional depende de GSK3 β . De hecho, la capacidad del MTX para reprogramar transcripcionalmente a los macrófagos hacia un fenotipo antitumoral fue suprimida por la inhibición de GSK3 β . En general, nuestros resultados establecen al MTX como un fármaco de reprogramación de macrófagos e indican que su capacidad para modular la polarización de macrófagos también puede subyacer a sus beneficios terapéuticos. Dado que la inhibición de GSK3 β impide la acción de reprogramación del MTX, nuestros resultados sugieren que el eje GSK3 β -MAFB/MAF constituye un objetivo para las estrategias antitumorales centradas en macrófagos.

Ríos I, López-Navarro B, Torres-Torresano M, Soler Palacios B, Simón-Fuentes M, Domínguez-Soto Á, Muller IB, Jansen G, Corbí ÁL, Puig-Kröger A. GSK3 β Inhibition Prevents Macrophage Reprogramming by High-Dose Methotrexate. *J Innate Immun.* 2023;15(1):283-296. doi: 10.1159/000526622. Epub 2022 Nov 14. PMID: 36380627; PMCID: PMC10643894.

GSK3 β Inhibition Prevents Macrophage Reprogramming by High-Dose Methotrexate

Israel Ríos^a Baltasar López-Navarro^a Mónica Torres-Torresano^a
Blanca Soler Palacios^{a, b} Miriam Simón-Fuentes^c Ángeles Domínguez-Soto^c
Ittai B. Muller^d Gerrit Jansen^e Ángel L. Corbí^c Amaya Puig-Kröger^a

^aUnidad de Inmunometabolismo e Inflamación, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ^bDepartamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; ^cMyeloid Cell Laboratory, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain; ^dDepartment of Clinical Chemistry, Amsterdam University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; ^eDepartment of Rheumatology and Clinical Immunology, Amsterdam University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Keywords

Methotrexate · Macrophages · Macrophage reprogramming

Abstract

Methotrexate (MTX) is an antifolate drug used as a chemotherapeutic agent for acute lymphoblastic leukemia, where MTX improves patients' prognosis. Macrophage reprogramming is being increasingly assessed as an antitumor therapeutic strategy. However, and although MTX limits the pathogenic action of macrophages in chronic inflammatory diseases, its effects on tumor-promoting macrophages have not been previously explored. We now report that MTX shapes the transcriptional and functional profile of M-CSF-dependent human macrophages, whose transcriptome is highly enriched in the gene signature that defines pathogenic tumor-associated macrophages ("large TAM"). Specifically, MTX prompted the acquisition of the gene signature of antitumoral "small TAM" and skewed macrophages toward an IL-6^{high} IFN β ^{high} IL-10^{low} phenotype upon subsequent stimulation. Mechanistically, the MTX-induced macrophage

reprogramming effect correlated with a reduction of the M-CSF receptor CSF1R expression and function, as well as a diminished expression of MAF and MAFB transcription factors, primary determinants of pro-tumoral macrophages whose transcriptional activity is dependent on GSK3 β . Indeed, the ability of MTX to transcriptionally reprogram macrophages toward an antitumoral phenotype was abrogated by inhibition of GSK3 β . Globally, our results establish MTX as a macrophage reprogramming drug and indicate that its ability to modulate macrophage polarization may also underlie its therapeutic benefits. Since GSK3 β inhibition abrogates the reprogramming action of MTX, our results suggest that the GSK3 β -MAFB/MAF axis constitutes a target for the macrophage-centered antitumor strategies.

© 2022 The Author(s).

Published by S. Karger AG, Basel

Israel Ríos and Baltasar López-Navarro contributed equally to this work.

Ángel L. Corbí and Amaya Puig-Kröger contributed equally to this work, and the order of authors is arbitrary.

Introduction

Tissue macrophages exhibit a huge functional plasticity, and they can exert proinflammatory or anti-inflammatory/resolving functions depending on their ontogeny and the prevailing extracellular cues [1, 2]. Regarding ontogeny, tissue-resident macrophages mostly perform a homeostatic role and reparative and anti-inflammatory functions during inflammation, whereas newly recruited macrophages usually display proinflammatory functions [1, 3–6]. Best exemplifying the influence of the environment on macrophage functional polarization, GM-CSF primes macrophages (GM-MØ) to acquire robust immunostimulatory and proinflammatory activity, whereas M-CSF prompts macrophages (M-MØ) to gain an anti-inflammatory and immunosuppressive (IL-10^{high} TNF^{low} IL-6^{low}) profile [7]. In line with their effector functions, M-MØ and GM-MØ exhibit distinct transcriptional profiles that resemble those of tumor-associated macrophages (TAM) and rheumatoid arthritis synovial macrophages in vivo [8, 9], respectively.

In the case of cancer, macrophages are involved in the initiation and progression of the tumor. TAM normally associate to bad prognosis as they are “educated” by tumor-derived factors (e.g., TGF- β , VEGF, M-CSF, IL-10) to exhibit anti-inflammatory, immunosuppressive, and pro-tumoral functions, lastly contributing to tumor progression, metastasis, and even resistance to chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy [2, 10]. Consequently, metabolic and functional reprogramming of macrophages is considered a promising therapeutic strategy for cancer and other inflammatory disorders, where deregulated polarization has a pathogenic role [10–12]. TAM reprogramming aims at converting immunosuppressive pro-tumoral macrophages into immunostimulatory and antitumor effector cells, and targeting various Toll-like receptors (TLR), the M-CSF/CSF1R axis, and its downstream effector PI3K γ have been already assayed to that end in clinical trials for cancer therapy [11, 13]. Indeed, blockade of M-CSF/CSF1R leads to macrophage reprogramming [14, 15] and loss of TAM in the tumor [16], while blockade of macrophage PI3K γ in an animal model of pancreatic ductal adenocarcinoma reprograms TAM for immunostimulation and inhibition of tumor metastasis [17, 18].

One-carbon metabolism, mediated by the folate cofactor, enables cancer growth and proliferation by supporting pyrimidine and purine biosynthesis, as well as amino acid homeostasis, epigenetic maintenance, and redox defense [19]. Inhibition of folate metabolism and/or nucle-

otide biosynthesis is an important anticancer strategy. The main antifolates in current clinical practice are methotrexate (MTX), which primarily targets dihydrofolate reductase and pemetrexed, which mostly targets thymidylate synthase [20]. MTX preferentially target rapidly dividing cells and is an important component of chemotherapy for breast cancer, head and neck cancer, non-Hodgkin lymphoma, osteosarcoma, bladder cancer, choriocarcinoma and for children with acute lymphoblastic leukemia (ALL), where high-dose MTX can significantly increase cure rates and improve patients’ prognosis [21–24]. However, the role of MTX in myeloid cells within the tumor microenvironment has not been previously explored.

We now report that MTX reprograms human M-CSF-primed monocyte-derived macrophages (M-MØ) at the transcriptional and functional level, and that the MTX reprogramming effect is dependent on GSK3 β . Mechanistically, MTX downregulates the expression of CSF1R and MAF/MAFB transcription factors and, consequently, impairs the acquisition of the MAF-dependent protumoral phenotype of M-MØ. Our results establish MTX as a macrophage reprogramming drug and evidence that its therapeutic benefits go beyond limiting tumor cell proliferation, suggesting that GSK3 β might be the final target of the antitumor strategies, aiming at CSF1R or PI3K γ .

Methods

Cell Culture

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats from normal donors over a Lymphoprep (Nycomed Pharma) gradient. Monocytes were purified from PBMC by magnetic cell sorting using CD14 microbeads (Miltenyi Biotech). Monocytes were cultured at 0.5×10^6 cells/mL for 7 days in RPMI 1640 (standard RPMI, which contains 1 mg/L folic acid) supplemented with 10% fetal calf serum, at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, and containing GM-CSF (1,000 U/mL; ImmunoTools) to generate GM-CSF-polarized macrophages (GM-MØ) or M-CSF (20 ng/mL; ImmunoTools) to generate M-CSF-polarized macrophages (M-MØ). GM-CSF or M-CSF was added every 2 days. MTX (MTX; Pfizer) and pemetrexed (PMX; Sigma-Aldrich) were used at 5 μ M on monocytes at the beginning of the differentiation procedure together with M-CSF or in 5-day M-CSF-differentiated macrophages. Where indicated, folic acid (FA; Sigma-Aldrich) was used at 500 μ M. MTX was dissolved in PBS, whereas PMX and FA were initially dissolved in H₂O and later in RPMI. Whenever MTX, PMX, or FA were used, control experiments were done by exposing macrophages to the same amount of solvent. LPS (10 ng/mL, 0111:B4 strain; InvivoGen), 2’3’cGAMP (10 μ g/mL; InvivoGen) was added at the indicated time points onto 7-day fully differentiated macrophages.

RNAseq and GSEA

Total RNA was isolated from three independent preparations and processed at BGI (<https://www.bgitechsolutions.com>), where library preparation, fragmentation, and sequencing were performed using the BGISEQ-500 platform. An average of 5.41 Gb bases was generated per sample and, after filtering, clean reads were mapped to the reference (UCSC Genome assembly hg38) using Bowtie2 (average mapping ratio 93.41%). Gene expression levels were calculated by using the RSEM software package. Differential gene expression was assessed by using DESeq2 algorithms using the parameters fold change >2 and adjusted *p* value <0.05. For gene set enrichment analysis (GSEA) (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>), the gene sets available at the website, as well as the “M-MØ-specific LPS-induced” and “GM-MØ-specific LPS-induced” gene sets (GSE99056), the M-MØ-specific and “GM-MØ-specific” gene sets (GSE188278), and the MAF and MAFB regulates genes (GSE155719). The gene signatures of Large Tumor-Associated macrophages (“Large TAM”) and “Small TAM” from colorectal liver metastasis were derived from GSE131353 [25]. “GM-MØ-specific” and “M-MØ-specific” gene sets include all the genes whose expression is significantly different in GM-MØ and M-MØ (adjusted *p* <0.05 and log₂ FC > 3). The “GM-MØ-specific” gene set includes 430 genes, and the “M-MØ-specific” gene set contains 216 genes (GSE188278). The data reported in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE186151 (MTX-treated M-MØ), GSE189740 (LPS activated MTX-treated M-MØ), GSE185872 (CHIR-99021-treated M-MØ), and GSE188278 (monocyte-to-macrophage differentiation).

Quantitative Real-Time RT-PCR

Total RNA was retrotranscribed, and cDNA was quantified using the Universal Human Probe Roche library (Roche Diagnostics). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed on a LightCycler® 480 (Roche Diagnostics). Assays were made in triplicates and results normalized according to the expression levels of TBP. Results were obtained using the $\Delta\Delta^{CT}$ method for quantitation. The oligonucleotides used to quantify mRNA transcripts were (5'-3'): GDF15 forward: cggataactcagccaga; GDF15 reverse: agagatacgcaggtgcaggt; INHBA forward: ctcggagatcatcagctttg; INHBA reverse: ccttggaatctcgaagctg; IL1 β forward: ctgtcctgctgttgaaga; IL1 β reverse: ttggtaattttgggatctaca; LIF forward: tgccaatgccctctttattc; LIF reverse: gtccaggtgttggggaac; TBP forward: cggctgttaactcgcttc; TBP reverse: cacacccaagaacagctga.

ELISA

Supernatants from M-MØ were tested for the presence of IL-6, IL-10 (BioLegend), and IFN β , CCL3, CCL4, and CCL8 (R&D Systems) following the procedures supplied by the manufacturers.

Western-Blot

Cell lysates were obtained in RIPA buffer containing 1 mM PIC (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma), 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, and 0.5 mM DTT. Ten to thirty micrograms cell lysate was subjected to SDS-PAGE and transferred onto an Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). For folate receptor beta (FOLR2, FR β), cell lysates were subjected to SDS-PAGE under nonreduced conditions. Protein detection was carried out using rabbit polyclonal antibodies against pp38, pJNK, and pERK (clones

D3F9, 81E11 and D13.14.4E; Cell Signaling, 1/1,000), pIRF3 (clone 4D4G; Cell Signaling, 1/1,000), pSTING (clone D7C3S; Cell Signaling, 1/1,000), STING (clone D2P2F; Cell Signaling, 1/1,000), pCSF1R (clone 49C10; Cell Signaling, 1/1,000), CD209 (dsg-1, 1/1,000) [26], MAF (sc-7866; Santa Cruz Biotech, 1/1,000), MAFB (clone O91E9; BioLegend, 1/1,000), and pSTAT3 (clone D3A7; Cell Signaling, 1/2,000), goat polyclonal against CSF1R (AF329; R&D Systems, 1/2,000), and mouse monoclonal antibody against human FOLR2 (FR β , kindly provided by Dr. Takami Matsuyama [27], 1/800). Protein loading was normalized using an antibody against GAPDH (clone 6C5; Santa Cruz Biotechnology, 1/2,000) or against human vinculin or tubulin (clone VIN-11-5, 6-11B-1; Sigma-Aldrich, 1/3,000).

Mixed Leukocyte Reaction

Five-day M-CSF-differentiated macrophages were exposed to 5 μ M MTX for 48 h. M-MØ and MTX-M-MØ (d5) were detached using PBS with 2 mM EDTA at 37°C, and replated in 96-well U-bottom plates (10⁴ cells/well) in RPMI with 5% human AB serum (Lonza). Allogeneic T-lymphocytes were isolated from PBMCs using CD3+ magnetic beads (Miltenyi Biotec) and co-cultured with macrophages at 1:10 M-MØ:T lymphocyte ratio for 4 days in RPMI with 5% human AB serum. Then, ³H-Thymidine (1 μ Ci/well; Perkin Elmer) was added and, after 16 h, radioactivity was transferred to a filter and thymidine counts measured in a scintillation counter (Perkin Elmer).

Statistical Analysis

Statistical analysis was done using GraphPad Prism, using parametric Student's *t* test, as appropriate, and one-way ANOVA test coupled with Tukey's post hoc test were indicated. Two-sided *p* value <0.05 was considered significant (**p* < 0.05; ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

Results

MTX Promotes Monocyte Differentiation into Macrophages with a Proinflammatory Transcriptional and Functional Profile

We have previously demonstrated that low-dose MTX enhances the proinflammatory nature of GM-CSF-dependent monocyte-derived macrophages (GM-MØ) via a p53/TS axis, whereas it has minimal effect on M-CSF-dependent macrophages (M-MØ) [28]. Since high-dose MTX is commonly used in cancer therapy [29, 30], we sought to determine the gene expression profile of M-MØ generated in the continuous presence of 5 μ M MTX (Fig. 1a), a concentration achieved in the plasma of ALL patients subjected to high-dose MTX therapy [31, 32]. RNAseq of the resultant cells revealed that MTX triggers an important transcriptional change as MTX-M-MØ exhibited significantly ($|\log_{2}FC| > 1$; adjusted *p* <0.05) enhanced expression of 764 genes and reduced expression of 100 genes (Fig. 1b). In line with our previous findings

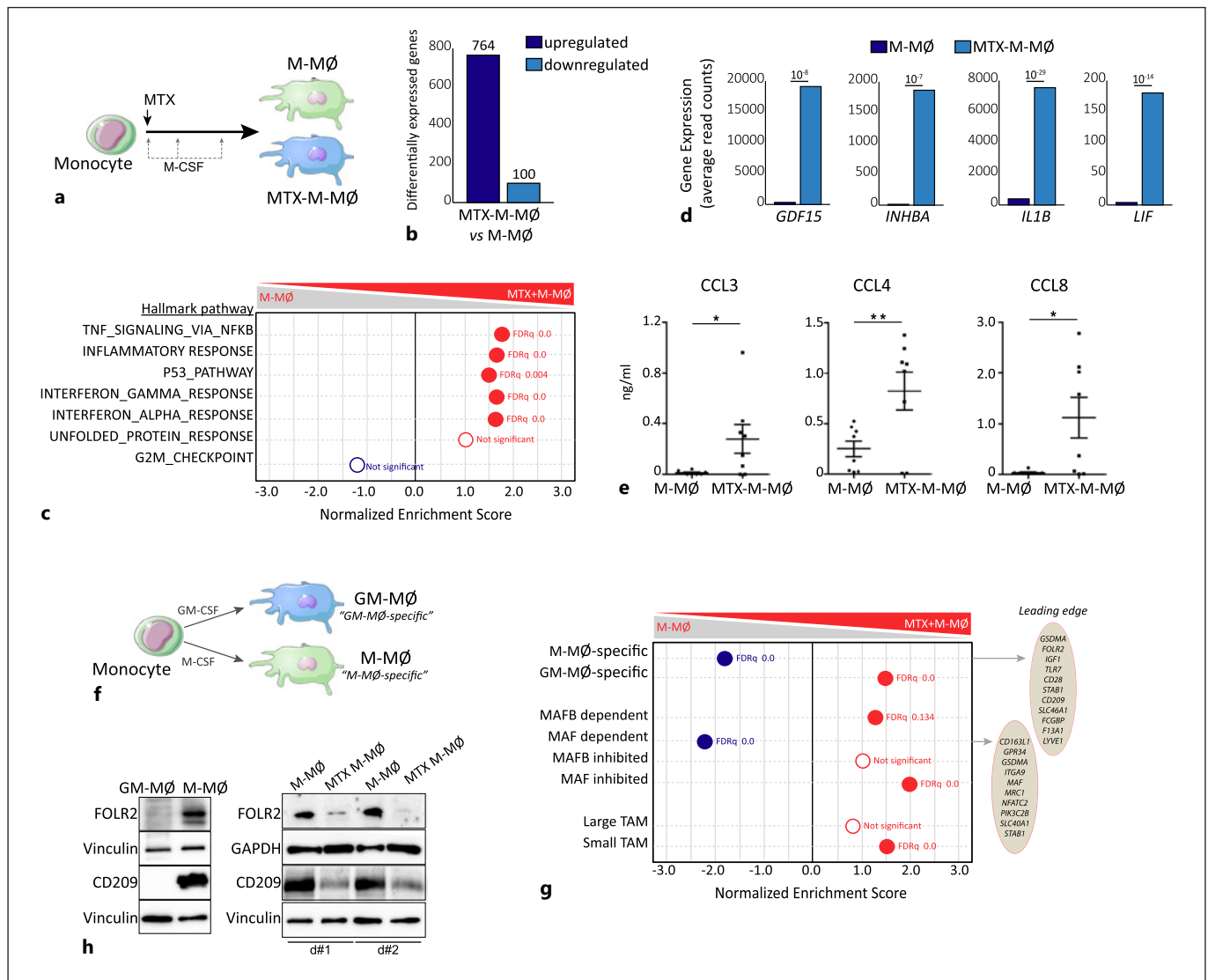


Fig. 1. High-dose MTX promotes a proinflammatory gene expression profile in M-CSF monocyte-derived macrophages. **a** Schematic representation of the experiments. Monocytes were untreated or exposed to 5 μM MTX at the beginning of the 7-day macrophage differentiation process with M-CSF, and the RNA levels were determined at day 7 on M-MØ and MTX-M-MØ. **b** Number of annotated genes whose expression is upregulated or downregulated in M-MØ after 7d of MTX treatment (adjusted $p < 0.05$). **c** Summary of GSEA with the indicated gene set on the ranked comparison of the transcriptomes of M-MØ versus MTX-M-MØ, using the Hallmarks v7.2 data set available at the website. False discovery rate (FDRq) is indicated (red, positive enrichment; blue, negative enrichment). The genes within the leading edge of each GSEA are indicated in online supplementary Table 1 (see www.karger.com/doi/10.1159/000526622 for all online suppl. material). **d** Relative level of expression of the indicated genes as determined by RNA-sequencing on M-MØ and MTX-M-MØ (GSE186151). **e** Production of CCL3, CCL4, and CCL8 by M-MØ and MTX-M-MØ (d5). Mean \pm SEM of 8 independent donors are shown ($*p <$

0.05, $**p < 0.01$, paired t test). **f** Schematic representation of the experiment. Monocytes were exposed to GM-CSF or M-CSF during the monocyte-to-macrophage differentiation process, and RNA levels were determined at day 7 on GM-MØ and M-MØ. The “GM-MØ-specific markers” and “M-MØ-specific markers” data set are available at GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (GSE188278). **g** Summary of GSEA of the genes significantly modulated by GM-CSF (GM-MØ-specific markers) and M-CSF (M-MØ-specific markers), the top 100 MAFB and MAF-regulated genes in M-MØ (GSE155719) and the “small TAM” and “large TAM” signatures (GSE131353) on the ranked comparison of M-MØ versus MTX-M-MØ transcriptomes. Informative genes found in the leading edge and FDRq are indicated (red, positive enrichment; blue, negative enrichment). **h** Immunoblot analysis of FOLR2 (FR β) and CD209 by monocytes differentiated with GM-CSF (GM-MØ) versus M-CSF (M-MØ) (left) and MTX-M-MØ versus M-MØ (right, two independent donors are shown). Vinculin and GAPDH protein levels were determined as protein loading controls.

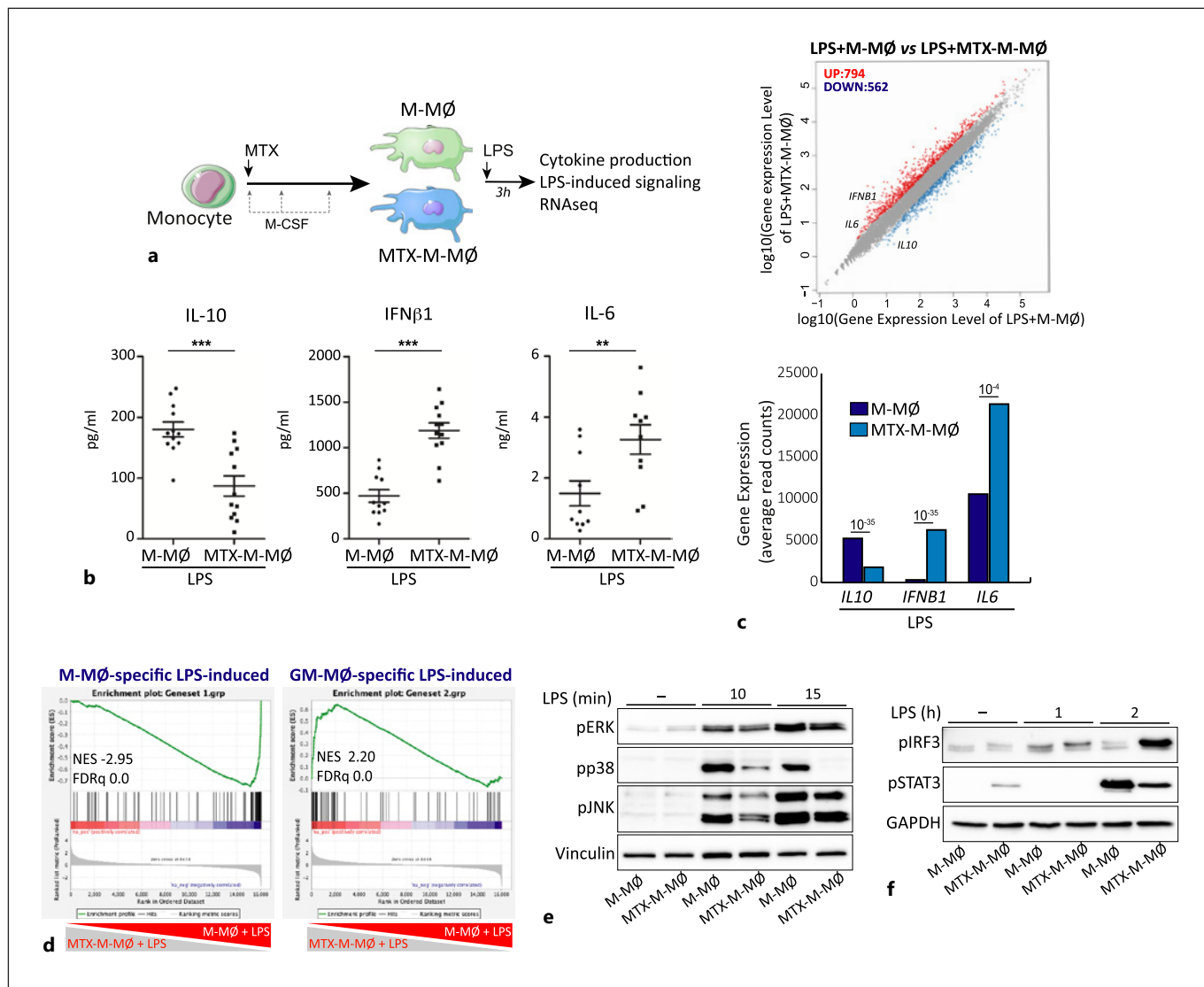


Fig. 2. LPS activated MTX-treated M-MØ exhibit a functional proinflammatory profile. **a** Experimental design. Monocytes were untreated or exposed to 5 μ M MTX at the beginning of the 7-day macrophage differentiation process with M-CSF and challenged with LPS (10 ng/mL) on day 7. Cells were assayed 3 h post-LPS stimulation on M-MØ and MTX-M-MØ. **b** Production of IL-10, IFN β , and IL-6 by M-MØ and MTX-M-MØ challenged with LPS for 3 h as determined by ELISA. Mean \pm SEM of 10–12 independent donors, each symbol represents a single donor (** p < 0.01, *** p < 0.001, paired t test). **c** Upper panel, scatter plot of RNAseq results showing gene expression changes 3 h post-LPS stimulation in MTX-M-MØ (LPS + MTX-M-MØ/LPS + M-MØ). The number of annotated genes whose expression is upregulated or downregulated 3 h post-LPS stimulation in M-MØ after 7 days of MTX treat-

ment (adjusted p < 0.05) is shown. Lower panel, relative level of expression of the indicated genes as determined by RNAseq on LPS + M-MØ and LPS + MTX-M-MØ, adjusted p value is indicated. **d** GSEA on the ranked comparison of the transcriptome of LPS + MTX-M-MØ versus LPS + M-MØ, using the genes significantly modulated by LPS in GM-MØ (GM-MØ-specific LPS-induced) and M-MØ (M-MØ-specific LPS-induced) as data set. The genes within the leading edge of each GSEA are indicated in online supplementary Table 1. **e, f** Immunoblot analysis of pERK, pJNK, and pp38 (**e**), pIRF3 and pSTAT3 (**f**) by monocytes differentiated with M-CSF in the absence or presence of MTX for 7 days and challenged with LPS for the indicated time points. Vinculin or GAPDH protein levels were determined as protein loading control.

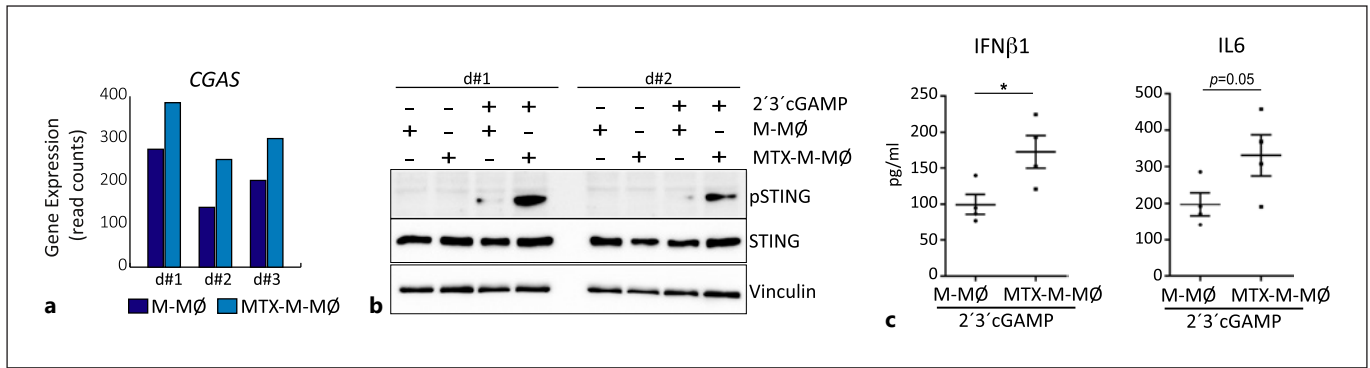


Fig. 3. cGAMP activated MTX-treated M-MØ exhibit higher functional proinflammatory profile than M-MØ. **a** Relative level of expression of CGAS as determined by RNA-sequencing on M-MØ and MTX-M-MØ (GSE186151). **b** Immunoblot analysis of pSTING by monocytes differentiated with M-CSF in the absence or presence of MTX for 7 days and challenged with 2'3'cGAMP for 2

[28], MTX-M-MØ were enriched in genes within the GSEA Hallmark “p53 PATHWAY” term and inflammatory responses, and showed a positive enrichment of “Interferon_alpha_response” and “Interferon_gamma_response” gene sets (Fig. 1c). Besides, MTX-M-MØ had augmented expression of MTX-response genes like *GDF15*, *INHBA*, and *LIF* (Fig. 1d), whose upregulation was completely prevented by an excess of FA (online suppl. Fig. 1A; see www.karger.com/doi/10.1159/000526622 for all online suppl. material), demonstrating the specificity of the responses. Besides, and in agreement with the Enrichment of the GSEA Hallmark “INFLAMMATORY RESPONSE” term (Fig. 1c), MTX-M-MØ showed a higher release of the monocyte-recruitment chemokines CCL3, CCL4, and CCL8 (Fig. 1e; online suppl. Fig. 1B). Further GSEA using “GM-MØ-specific” or “M-MØ-specific” gene sets (Fig. 1f) revealed that MTX-M-MØ are positively enriched in “GM-MØ-specific” genes and also show a very significant reduction in the expression of paradigmatic “M-MØ-specific” genes like *FOLR2*, *CD28*, *IGF1*, and *CD209* (Fig. 1g). Indeed, MTX-M-MØ displayed much lower expression of FOLR2 and CD209 proteins than untreated M-MØ (Fig. 1h), supporting the relevance of the transcriptional changes induced by MTX on macrophages. Thus, exposure to high-dose MTX drives monocytes to differentiate into macrophages with reduced expression of M-MØ-specific genes and higher expression of the genes that define proinflammatory GM-MØ.

The functional consequences of the continuous exposure to MTX were next assessed through the determina-

tion of the cytokine profile of MTX-M-MØ upon exposure to pathogen-associated or danger-associated molecular stimuli. Regarding pathogenic stimuli (Fig. 2a), LPS-treated MTX-M-MØ produced higher levels of IL-6 and IFNβ1, but lower levels of IL-10, than M-MØ (Fig. 2b). Moreover, the comparison of the transcriptomes of LPS-treated M-MØ and LPS-treated MTX-M-MØ (Fig. 2c) confirmed the stronger proinflammatory nature of MTX-M-MØ (lower *IL-10* and higher *IL-6* and *IFNB1* expression after LPS exposure) (Fig. 2c, lower panel). A similar conclusion was reached through GSEA using the recently described “M-MØ-specific LPS-induced” and “GM-MØ-specific LPS-induced” gene sets (GSE99056) [33] since LPS-treated MTX-M-MØ showed a positive enrichment of the latter but a negative enrichment of the “M-MØ-specific LPS-induced” gene set (Fig. 2d). In line with these findings, and compared to untreated M-MØ, LPS induced lower levels of phosphorylation of ERK, JNK, p38 MAPK, and STAT3 (Fig. 2e, f), but higher IRF3 activation (Fig. 2f) in MTX-M-MØ, implying that MTX also affects LPS-initiated intracellular signaling in M-MØ. Altogether, these results indicate that MTX conditions monocytes to differentiate into macrophages with a proinflammatory transcriptional and functional profile.

In the case of danger-associated stimuli, and since the expression of CGAS (that codes for cGAMP synthase) was higher in MTX-M-MØ compared to untreated M-MØ (Fig. 3a), we explored the effect of MTX on the cGAS-cGAMP-STING pathway, which detects tumor-derived DNA and generates antitumor immunity via the TBK1-IRF3-dependent production of IFNβ and the

The medium was replaced for folic acid-free RPMI with 10% FCS for the final 16 h. Vinculin protein levels were determined as protein loading control. **c** Production of IFNβ and IL-6 by M-MØ and MTX-M-MØ challenged with 2'3'cGAMP for 7 h. Mean ± SEM of 4 independent donors are shown (**p* < 0.05, paired *t* test).

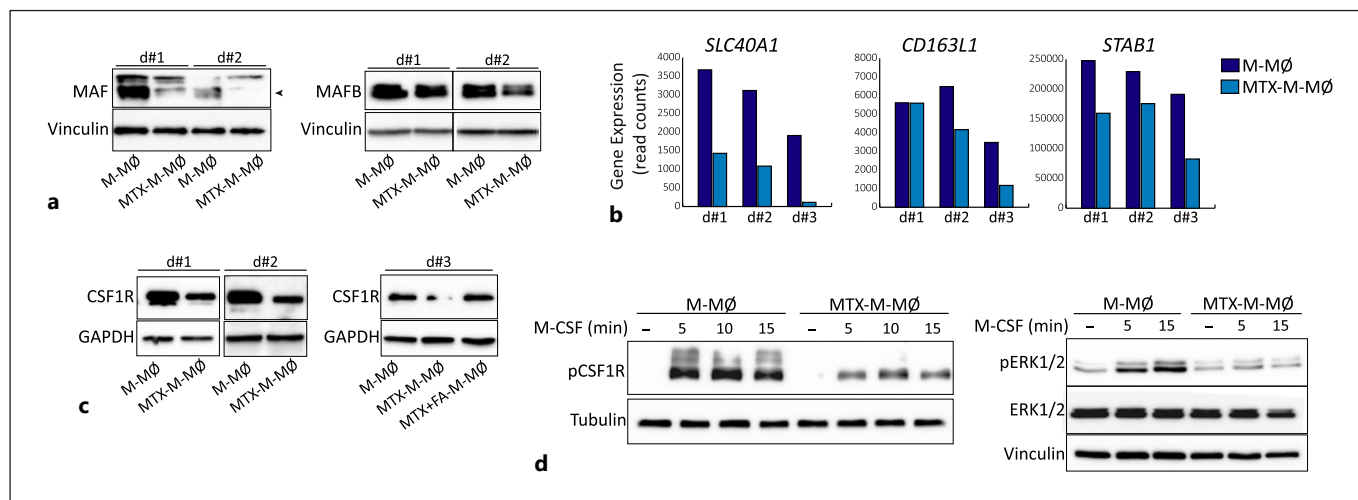


Fig. 4. MTX modulates the expression of MAF, MAFB, and CSF1R in M-CSF monocyte-derived macrophages. **a** Immunoblot analysis of MAF and MAFB by M-M \emptyset and MTX-M-M \emptyset . **b** Relative level of expression of the indicated genes as determined by RNA-sequencing on M-M \emptyset and MTX-M-M \emptyset (GSE186151). **c** Left, Immunoblot analysis of CSF1R by M-M \emptyset and MTX-M-M \emptyset . Right, immunoblot analysis of CSF1R by M-M \emptyset , MTX-M-M \emptyset , or MTX-

M-M \emptyset exposed to FA. GAPDH protein levels were determined as protein loading control. **d** Immunoblot analysis of pCSF1R (left), pERK1/2, and total ERK (right) by M-M \emptyset and MTX-M-M \emptyset challenged with M-CSF for the indicated time points. For **a**, **c**, **d**, two-three independent donors are shown. Vinculin, tubulin, or GAPDH protein levels were determined as protein loading control. Arrowheads indicate the protein of interest.

NF κ B pathway [34]. To that end, macrophages were exposed to cGAMP, and the phosphorylation of STING and the cytokine profile was determined. Compared to untreated M-M \emptyset , cGAMP induced higher STING activation (Fig. 3b) and higher levels of IL-6 and IFN β 1 in MTX-M-M \emptyset (Fig. 3c), thus indicating that MTX also alters macrophages-responses to a danger-associated stimulus commonly present in the tumor microenvironment.

To determine the extent of the influence of MTX on the M-CSF-driven differentiation of M-M \emptyset , we also evaluated the effect of MTX on the expression of genes whose up or downregulation along monocyte differentiation is specifically promoted by either M-CSF or GM-CSF (online suppl. Fig. 2A). GSEA results indicated that MTX-M-M \emptyset are very significantly enriched in genes exclusively upregulated along monocyte-to-GM-M \emptyset differentiation (“upregulated Mo-to-GM-M \emptyset -specific,” online suppl. Fig. 2B, C), while they show a negative enrichment of genes exclusively upregulated along monocyte-to-M-M \emptyset differentiation (“Upregulated Mo-to-M-M \emptyset -specific,” online suppl. Fig. 2B, C). Furthermore, the exact opposite results were obtained, when GSEA was done on “downregulated Mo-to-GM-M \emptyset -specific” and on “downregulated Mo-to-M-M \emptyset -specific” gene sets (online suppl. Fig. 2B, C). Therefore, and combined with the above findings, our results demonstrate that MTX modifies the transcrip-

tional changes that take place along M-CSF-driven monocyte-to-macrophage differentiation.

Altered Expression of MAF, MAFB, and CSF1R upon M-M \emptyset Differentiation in the Presence of MTX

The M-CSF-driven differentiation of M-M \emptyset is dependent on CSF1R as well as on the transcription factors MAF and MAFB [35–38]. In fact, Maf controls the expression of *Csf1r* in mouse macrophages, where it serves as a switch for the generation of tumor growth-promoting macrophages [39]. In line with their altered transcriptome, MTX-M-M \emptyset exhibited lower expression of both MAF and MAFB proteins (Fig. 4a). In fact, the expression of MAF-dependent genes like *CD163L1*, *SLC40A1*, and *STAB1* [40] (GSE155719) was lower in MTX-M-M \emptyset compared to untreated M-M \emptyset (Fig. 1g, 4b). Of note, expression of the CSF1R-encoded M-CSF receptor was also lower in MTX-M-M \emptyset compared to untreated M-M \emptyset , a decreased that was abrogated by FA (Fig. 4c). In line with the lower CSF1R expression, M-CSF stimulation of MTX-M-M \emptyset resulted in diminished phosphorylation of CSF1R and impaired ERK activation (Fig. 4d). Therefore, MTX provokes monocytes to differentiate into macrophages with reduced expression of the factors that determine the acquisition of their pro-tumoral profile, namely, MAF, MAFB, and CSF1R.

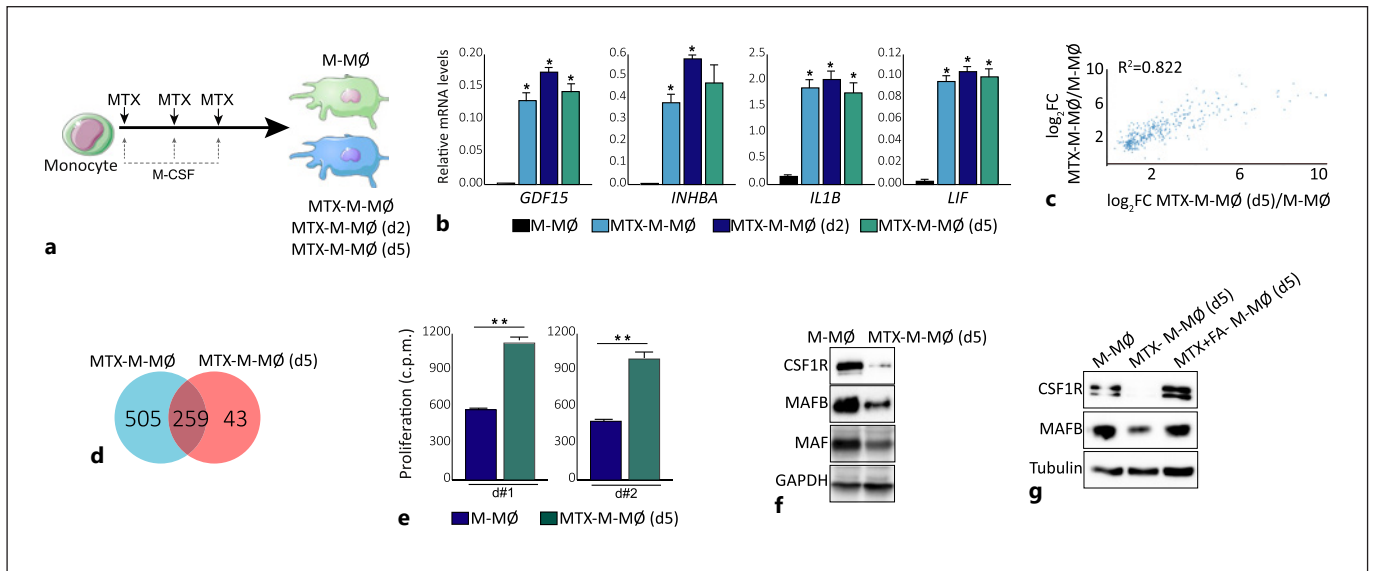


Fig. 5. MTX modulates the expression of MAF, MAFB, and CSF1R in M-MØ. **a** Schematic representation of the experiment. Monocytes were differentiated to macrophages in the presence of M-CSF for 7 days. Five micromolar MTX was added once on monocytes [MTX-M-MØ], or on 2 days (MTX-M-MØ [d2]) or 5 days (MTX-M-MØ [d5]) after the beginning of the differentiation process with M-CSF. RNA or protein levels were determined at day 7. **b** Relative mRNA expression levels of the indicated genes as determined by qRT-PCR on M-MØ, MTX-M-MØ, MTX-M-MØ (d2), and MTX-M-MØ (d5). Mean \pm SEM of three independent donors are shown. Groups were compared by applying one-way ANOVA (with Tukey's post hoc test, * $p < 0.05$). **c** Scatter plot of RNAseq results showing upregulated expression gene changes in MTX-M-MØ

versus MTX-M-MØ (d5). **d** Venn diagram comparing the genes differentially expressed by MTX in MTX-M-MØ with the genes significantly altered by MTX in and MTX-M-MØ (d5). **e** Allogeneic CD3⁺ T-lymphocyte proliferation promoted by M-MØ and MTX-M-MØ (d5). Shown are two experiments using independent preparations of M-MØ. Mean \pm SEM of six replicates performed in each experiment are shown (** $p < 0.01$). **f** Immunoblot analysis of CSF1R, MAFB, and MAF by M-MØ and MTX-M-MØ (d5). GAPDH protein levels were determined as protein loading control. **g** Immunoblot analysis of CSF1R and MAFB by M-MØ, MTX-M-MØ (d5), or MTX-M-MØ (d5) exposed to FA. Tubulin protein levels were determined as protein loading control.

MTX Downregulates the Expression of MAF, MAFB, and CSF1R in M-CSF-Dependent Macrophages

Once we had demonstrated that MTX modulates the monocyte-to-macrophage differentiation, we decided to assess whether MTX could also alter the phenotype and function of differentiating macrophages. To that end, MTX was added at later time points along the monocyte-to-M-MØ differentiation process (at days 2 or 5) (Fig. 5a), and the resulting cells [MTX-M-MØ (d2) and MTX-M-MØ (d5)] were compared to M-MØ generated from MTX-treated monocytes (MTX-M-MØ). A similar upregulation of the MTX-dependent genes *GDF15*, *INHBA*, *IL1B*, and *LIF* was seen after exposure to MTX at the three time points (Fig. 5b), indicating that MTX also affects the transcriptome of differentiating M-MØ. In fact, comparison of the whole transcriptome of MTX-M-MØ and MTX-M-MØ (d5) revealed a strong overlapping of the genes whose expression is significantly upregulated in MTX-M-MØ and MTX-M-MØ (d5), as well as a positive

correlation between their respective level of upregulation ($R^2 = 0.822$) (Fig. 5c, d). At the functional level, LPS-treated MTX-M-MØ (d5) produced higher levels of IFN β 1 and lower levels of IL-10 than M-MØ (see Fig. 6f). We also assessed the T-cell stimulatory capability of MTX-M-MØ (d5) because TAMs are usually immunosuppressive [2, 41]. MTX-M-MØ (d5) showed an allostimulatory capacity that was 50% higher than the T-cell response elicited by control M-MØ (Fig. 5e). More importantly, MTX-M-MØ (d5) showed diminished MAF and MAFB protein levels as well as reduced expression of CSF1R (Fig. 5f). Like in the case of monocytes (Fig. 4c), the specificity of the MTX-induced loss of CSF1R and MAFB in MTX-M-MØ (d5) was completely abrogated by FA (Fig. 5g). Therefore, a 48 h exposure to high-dose MTX also reprograms macrophages toward the loss of MAF, MAFB, and CSF1R, and the subsequent acquisition of a more proinflammatory and immunogenic profile.

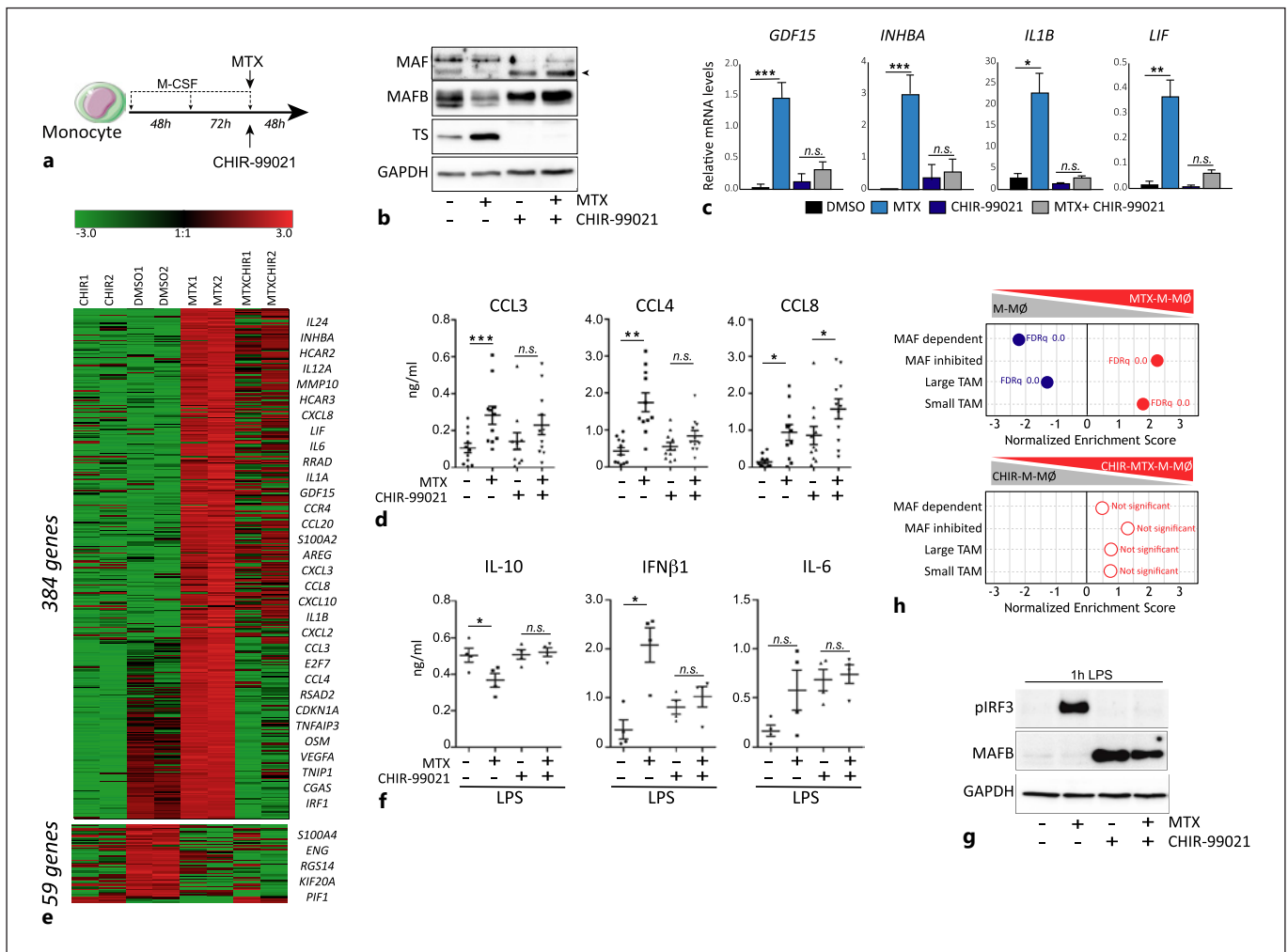


Fig. 6. GSK3 β inhibition prevents the reprogramming ability of MTX on M-MØ. **a** Experimental design. Monocytes were differentiated to M-MØ with M-CSF. On day 5, cells were untreated (DMSO, vehicle) or exposed to 5 μ M MTX, 10 μ M CHIR-99021 or both, and the RNA and protein levels were determined at day 7. **b** Immunoblot analysis of MAF, MAFB, and TS by M-MØ and MTX-M-MØ (d5) unexposed or exposed to CHIR-99021. GAPDH protein levels were determined as protein loading control. Arrowheads indicate the protein of interest. **c** Gene expression of the indicated genes determined by qRT-PCR on M-MØ and MTX-M-MØ (d5). MTX and CHIR-99021 were added on day 5 and gene expression determined at day 7. Mean \pm SEM of 5 independent donors are shown. Groups were compared by applying one-way ANOVA (with Tukey's post hoc test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001). **d** Production of CCL3, CCL4, and CCL8 by M-MØ and MTX-M-MØ (d5) unexposed or exposed to CHIR-99021. Mean \pm SEM of 11 independent donors are shown. Groups were compared by applying one-way ANOVA (with Tukey's post hoc test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001). **e** Heatmap of the expression of

genes significantly ($|\log FC| > 1$; *p* < 0.05) altered by MTX in the absence or in the presence of CHIR-99021 as determined by RNA-seq and using Genesis (https://genome.tugraz.at/genesisclient/genesisclient_description.shtml). **f** Production of IL-10, IFN β , and IL-6 by M-MØ and MTX-M-MØ (d5) unexposed or exposed to CHIR-99021 and challenged with LPS for 3 h. Mean \pm SEM of 4 independent donors are shown. Groups were compared by applying one-way ANOVA (with Tukey's post hoc test, **p* < 0.05). **g** Immunoblot analysis of pIRF3 and MAFB by M-MØ and MTX-M-MØ (d5) challenged with LPS for 1 h. GAPDH protein levels were determined as protein loading control. **h** Summary of GSEA of the top 100 MAF-regulated genes in M-MØ versus MTX-M-MØ (d5) transcriptomes (upper panel) and "small TAM" and "large TAM" signatures (GSE131353) on the ranked comparison of M-MØ versus MTX-M-MØ (d5) transcriptomes (lower panel). FDRq is indicated (red, positive enrichment; blue, negative enrichment). The genes within the leading edge of each GSEA are indicated in online supplementary Table 1.

GSK3 β Inhibition Prevents the Reprogramming Ability of MTX on Human Macrophages

The protein levels and activity of the transcription factors of the “large MAF” family (MAF, MAFA, MAFB, NRL) are dependent on the phosphorylation of their transcriptional activation domains by GSK3 β [42]. In fact, mutations affecting the GSK3 β phosphorylation sites of “large MAF” factors result in pathologies like Aymé-Gripp syndrome (MAF), Multicentric Carpotarsal Osteolysis (MAFB), and Retinitis Pigmentosa (NRL) [42, 43]. Thus, we next assessed whether GSK3 β had a role on the MTX macrophage reprogramming ability. To that end, we generated MTX-M-M \emptyset (d5) both in the presence and absence of the GSK3 β inhibitor CHIR-99021 [44], which was added immediately before MTX (Fig. 6a). CHIR-99021 pretreatment prevented the downregulation of MAF, MAFB (Fig. 6b) and the upregulation of TS (Fig. 6b) in MTX-M-M \emptyset (d5). Besides, the GSK3 β inhibitor abrogated the upregulation of MTX-responsive genes *GDF15*, *INHBA*, *LIF*, and *IL1B* in MTX-M-M \emptyset (d5) (Fig. 6c) and the chemokines *CCL3* and *CCL4* (Fig. 6d). In fact, comparison of the global gene expression profile of MTX-M-M \emptyset (d5) with or without CHIR-99021 evidenced that CHIR-99021 abolished all the significant ($|\log_{2}FC| > 1$; adjusted $p < 0.05$) MTX-induced transcriptional changes (384 upregulated, 59 downregulated) observed in MTX-M-M \emptyset (d5) (Fig. 6e). Therefore, GSK3 β inhibition impairs the macrophage transcriptional reprogramming caused by MTX. At the functional level, CHIR-99021 pretreatment reverted the lower production of IL-10 observed in MTX-M-M \emptyset (d5) (Fig. 6f), as well as their higher production of IFN β 1 (Fig. 6f), thus implying that GSK3 β inhibition also abrogates the functional reprogramming of human macrophages by MTX. Moreover, and regarding intracellular signaling, inhibition of GSK3 β blocked the LPS-induced IRF3 activation in MTX-M-M \emptyset (d5) (Fig. 6g). Altogether, these results demonstrate that the transcriptional and functional reprogramming capacity of MTX on M-CSF-primed macrophages can be fine-tuned through modulation of GSK3 β activity.

Apart from MTX, pemetrexed (PMX) is another antifolate used as chemotherapeutics in mesothelioma and non-small cell lung cancer [45]. To assess whether the MTX reprogramming action can be also extrapolated to other clinically relevant antifolates, the effect of PMX on the transcriptional and functional state of human macrophages was analyzed. Like in the case of MTX, PMX upregulated MTX-dependent genes (online suppl. Fig. 3A) and downregulated the expression of MAFB in a GSK3 β -

dependent manner (online suppl. Fig. 3B). Additionally, PMX reduced IL-10 expression and increased IFN β 1 release from differentiating M-M \emptyset after LPS activation (online suppl. Fig. 3C). Hence, the transcriptional and functional reprogramming action of antifolates on macrophages can be prevented by inhibition of GSK3 β .

Finally, gene ontology analysis provided additional support for these experimental results. On the one hand, GSEA showed that GSK3 β inhibition prevents the modulation of genes positively and negatively regulated by MAF in MTX-M-M \emptyset (d5) (Fig. 6h), indicating that a correlation exists between the expression of MAF-regulated genes and the GSK3 β -dependent macrophage reprogramming ability of MTX. On the other hand, GSEA indicated that MTX-M-M \emptyset showed a significant enrichment of the gene set that defines the transcriptome of “small TAM,” whose presence correlates with good prognosis [25] (Fig. 1g). A similar trend was observed in MTX-M-M \emptyset (d5) (Fig. 6h, upper panel). However, CHIR-99021 pretreatment abrogated such a positive enrichment of the “small TAM”-specific gene set (Fig. 6h, lower panel). This result is remarkable because it implies that MTX is capable of skewing the polarization of human macrophages toward the antitumoral side, and that the MTX-induced upregulation of the “small TAM”-specific gene set can be abrogated through inhibition of GSK3 β . Therefore, the antitumoral effects of MTX might not be limited to its antiproliferative action on tumor cells but may also result from its ability to “reeducate” macrophages, an effect dependent on the GSK3 β -MAF axis.

Discussion

We have previously shown that low-dose MTX promotes a “trained” pro-tolerant state in GM-CSF-primed macrophages through TS- and p53-dependent mechanisms [28, 46]. Given this effect of MTX, we hypothesized that high-dose MTX, used as an antiproliferative drug in various types of cancer [20, 24], might also influence the differentiation and polarization state of anti-inflammatory and immunosuppressive monocyte-derived macrophages. We now report that MTX reprograms human M-CSF-primed monocyte-derived macrophages, whose transcriptional and functional profiles resembles that of pro-tumoral TAMs, and that MTX reprogramming can be abrogated through inhibition of GSK3 β , the kinase that controls the stability and transcriptional activity of both MAF and MAFB [42]. Mechanistically, MTX downregulates the expression of CSF1R and the MAF transcription factor and,

consequently, impairs the MAFB/MAF-dependent pro-tumoral phenotype of M-MØ and favors the acquisition of a proinflammatory cytokine profile. Thus, our results establish that the therapeutic benefits of MTX go beyond limiting tumor cell proliferation and include a robust macrophage reprogramming ability. It is also worth noting that MTX is capable of reprogramming monocyte-derived macrophages, which significantly contribute to the pool of macrophages present in tumors, produce factors that enable most of the hallmarks of cancer [41], and are also pathogenic in inflammatory diseases [47]. Since tissue-resident and monocyte-derived macrophages play distinct functional roles during inflammatory responses [3], it would be of interest to determine whether MTX might also affect the polarization state of tissue-resident macrophages.

Tumor-infiltrating macrophages have a critical role in tumor cell growth and metastasis, immunosuppression, and treatment resistance [2, 48]. In fact, TAM associate with poor prognosis in numerous types of tumors [2, 49], as they inhibit the generation of effective antitumor immune responses. Consequently, the elimination of the immunosuppressive activity of TAM through macrophage reprogramming is a major goal of novel therapeutic strategies in cancer [11, 49–54]. Currently, clinical assays are underway to evaluate the validity of abrogating TAM immunosuppressive activity via macrophage reprogramming strategies [11, 49–52, 55]. Among them, drugs affecting the M-CSF/CSF1R axis and PI3K γ are being tested in advanced solid tumors, glioblastoma, sarcoma, breast cancer, and renal cell carcinoma [11, 49, 56]. The involvement of GSK3 β and MAFB/MAF in the ability of MTX to re-program macrophages toward the proinflammatory and immunostimulatory side agrees with these two approaches, because M-CSF and PI3K γ negatively regulate the GSK3 β activity [42, 57]. Specifically, M-CSF binding to CSF1R leads to PI3K γ activation [57], which ends up augmenting the inhibitory phosphorylation of GSK3 and, consequently, in higher stability and protein levels of MAF and MAFB [42]. Therefore, the ability of MTX to inhibit CSF1R and MAFB/MAF protein levels implies that MTX tackles a critical axis (CSF1R – PI3K γ – GSK3 β – MAFB/MAF) for the acquisition of the immunosuppressive and anti-inflammatory profile of human macrophages. By analogy with the action of MTX, it is tempting to speculate that GSK3 β activity might be also the final target of current antitumor strategies focused on CSF1R or PI3K γ . Besides, it might be worthy to assess whether other antifolates used as antitumor drugs (pemetrexed [PMX]) also display the macrophage reprogramming ability that we now report for MTX.

The effect of MTX on the expression of MAF is of particular interest because MAF appears to be directly associated to the acquisition of the immunosuppressive phenotype of TAM [39, 58] and also regulates IL-10 expression in mouse macrophages [59]. Studies on animal models of lung cancer have now shown that MAF is highly expressed in TAM, where it controls the immunosuppressive polarization and function and the expression of the *Csf1r* gene [39]. In fact, murine *Maf* downregulation results in enhanced antitumor immunity, and human MAF has been detected in tumor-infiltrating macrophages/monocytes and circulating monocytes from non-small cell lung carcinoma (NSCLC) patients [39]. In addition, mouse *Maf* positive regulates the expression of IL-10 [59], the paradigmatic anti-inflammatory cytokine that contributes to establish an anti-inflammatory and immunosuppressive environment in the tumor stroma. Although human IL-10 expression is more dependent on MAFB than on MAF (Simon-Fuentes et al. [33]), the reduced production of IL-10 by LPS-stimulated MTX-M-MØ concurs with the reduced expression of MAF and MAFB in MTX-treated macrophages, thus indicating that IL-10 might be the common link between the anti-inflammatory and the reprogramming ability of MTX.

The pathological relevance of the reprogramming effect of MTX on human macrophages is supported by gene ontology analysis on the transcriptional signature of TAM. The analysis of TAM from colorectal liver metastasis has identified two morphologically distinct TAM subsets (“large TAM” and “small TAM”) which exhibit distinct gene profiles and whose presence has prognostic significance [25]. Remarkably, the transcriptome of “large TAM” is very significantly enriched in M-MØ-specific genes [60, 61], whereas “small TAM” show an over-representation of the genes that define the GM-MØ-specific gene profile [60, 61] (data not shown). Extensive GSEA has revealed that MTX also favors the acquisition of genes that specifically define the “small TAM” transcriptome, and that this effect is impaired by a GSK3 β inhibitor. Therefore, the GSK3 β -dependent macrophage reprogramming ability of MTX could be also taken into consideration when designing combined therapeutic strategies to target myeloid cells in the tumor stroma. In this regard, PMX, another antifolate commonly used for therapy in NSCLC has recently being shown to modulate innate immune pathways in an animal model of NSCLC [62]. This previous result agrees with our finding on the ability of PMX to reprogram human differentiating macrophages.

The main limitation of our study is that the analysis of MTX effects has been restricted to in vitro generated monocyte-derived macrophages. Whereas, the molecular mechanisms we describe are clearly initiated by MTX and are dependent on MAFB/MAF-driven differentiation, we cannot rule out the possibility that additional mechanisms might be operative in vivo. That is why we are currently addressing the study of the effects of MTX on ex vivo isolated macrophages, and we are currently engaged in analyzing its actions on pathogenic tumor-associated macrophages from patients receiving MTX for therapeutic purposes as well as on a clinical assay (EudraCT number 2017-002902-11) to assess the in vivo effects of MTX on the differentiation capability of human monocytes. As a whole, our results indicate that MTX reprograms human M-CSF-primed monocyte-derived macrophages at the transcriptional and functional level in a GSK3 β -dependent manner and imply that the GSK3 β -MAFB/MAF axis constitutes a target for macrophage-centered antitumor strategies. Besides, our results also suggest that the macrophage reprogramming ability of MTX may contribute to its therapeutic benefits in leukemia and rheumatoid arthritis, an issue that deserves further investigation.

Statement of Ethics

Research was conducted ethically in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical permission was approved by the Ethical Committee at Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Report number 01/2020). Informed written consent was obtained from each human subject.

References

- 1 Hoeffel G, Ginhoux F. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell Immunol.* 2018;330:5–15.
- 2 Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell.* 2015;27(4):462–72.
- 3 Liao X, Shen Y, Zhang R, Sugi K, Vasudevan NT, Alaiti MA, et al. Distinct roles of resident and nonresident macrophages in nonischemic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(20):E4661–9.
- 4 Udalova IA, Mantovani A, Feldmann M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(8):472–85.
- 5 Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity.* 2014;41(1):21–35.
- 6 Italiani P, Boraschi D. Development and functional differentiation of tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in inflammatory reactions. *Results Probl Differ.* 2017;62:23–43.
- 7 van Overmeire E, Stijlemans B, Heymann F, Keirsse J, Morias Y, Elkrim Y, et al. M-CSF and GM-CSF receptor signaling differentially regulate monocyte maturation and macrophage polarization in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2016;76(1):35–42.
- 8 Soler Palacios B, Estrada-Capetillo L, Izquierdo E, Criado G, Nieto C, Municio C, et al. Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin A-dependent pro-inflammatory profile. *J Pathol.* 2015;235(3):515–26.
- 9 Gonzalez-Dominguez E, Samaniego R, Flores-Sevilla JL, Campos-Campos SF, Gomez-Campos G, Salas A, et al. CD163L1 and CLEC5A discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo. *J Leukoc Biol.* 2015;98(4):453–66.
- 10 Belgiovine C, Digifico E, Anfray C, Ummarino A, Torres Andon F. Targeting tumor-associated macrophages in anti-cancer therapies: convincing the traitors to do the right thing. *J Clin Med.* 2020;9(10):3226.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no potential conflicts of interest.

Funding Sources

This work was supported by Grant PI17/00037 and PI20/00316 from Instituto de Salud Carlos III to A.P.K., Grant PID2020-114323RB-I00 from Ministerio de Ciencia e Innovación to A.L.C., “Ayudas FUNDACIÓN BBVA a equipos de investigación científica SARS-CoV-2 y COVID-19” to A.L.C., and Red de Investigación en Enfermedades Reumáticas (RIER, RD16/0012/0007), and cofinanced by the European Regional Development Fund “A way to achieve Europe” (ERDF), to A.L.C. and A.P.K. This research work was funded by the European Commission-NextGeneration-EU, through CSICs Global Health Platform (PTI Salud Global). This work was supported in part by a grant from the Dutch Society for Clinical Chemistry (NVKC) to I.B. Muller and R. de Jonge. M.S.F. was funded by a Formación de Personal Investigador predoctoral fellowship from Ministerio de Ciencia e Innovación (Grant PRE2018-083396).

Author Contributions

Israel Ríos, Baltasar López-Navarro, Mónica Torres-Torresano, Blanca Soler Palacios, Miriam Simón-Fuentes, Ángeles Domínguez-Soto, and Ittai B. Muller performed research and analyzed data; Gerrit Jansen, Ángel L. Corbí, and Amaya Puig-Kröger designed the research and analyzed the data; Ángel L. Corbí and Amaya Puig-Kröger wrote the paper.

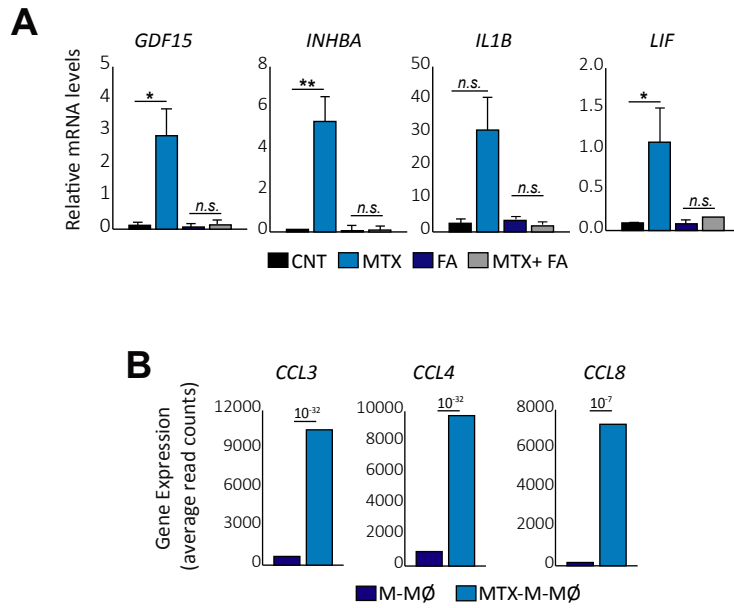
Data Availability Statement

The data set supporting the conclusions of this article is available in the Gene Expression Omnibus repository (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GSE186151, GSE188278, GSE189740, and GSE185872.

- 11 Bart VMT, Pickering RJ, Taylor PR, Ipseiz N. Macrophage reprogramming for therapy. *Immunology*. 2021;163(2):128–44.
- 12 Schultze JL. Reprogramming of macrophages: new opportunities for therapeutic targeting. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;26:10–5.
- 13 Cai H, Zhang Y, Wang J, Gu J. Defects in macrophage reprogramming in cancer therapy: the negative impact of PD-L1/PD-1. *Front Immunol*. 2021;12:690869.
- 14 Ao JY, Zhu XD, Chai ZT, Cai H, Zhang YY, Zhang KZ, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor blockade inhibits tumor growth by altering the polarization of tumor-associated macrophages in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(8):1544–54.
- 15 Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med*. 2013;19(10):1264–72.
- 16 Anderson NR, Minutolo NG, Gill S, Klichinsky M. Macrophage-based approaches for cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 2021;81(5):1201–8.
- 17 Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, Li H, Leem CJ, Gorjestani S, et al. PI3K γ is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature*. 2016;539(7629):437–42.
- 18 Kaneda MM, Cappello P, Nguyen AV, Ralainirina N, Hardamon CR, Foubert P, et al. Macrophage PI3K γ drives pancreatic ductal adenocarcinoma progression. *Cancer Disc*. 2016;6(8):870–85.
- 19 Ducker GS, Rabinowitz JD. One-carbon metabolism in health and disease. *Cell Metab*. 2017;25(1):27–42.
- 20 Gonen N, Assaraf YG. Antifolates in cancer therapy: structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resist Updat*. 2012;15(4):183–210.
- 21 de Beaumais TA, Jacqz-Aigrain E. Intracellular disposition of methotrexate in acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr Drug Metab*. 2012;13(6):822–34.
- 22 Evans WE, Crom WR, Abromowitch M, Dodge R, Look AT, Bowman WP, et al. Clinical pharmacodynamics of high-dose methotrexate in acute lymphocytic leukemia. Identification of a relation between concentration and effect. *N Engl J Med*. 1986;314(8):471–7.
- 23 Assaraf YG. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(1):153–81.
- 24 Zarou MM, Vazquez A, Vignir Helgason G. Folate metabolism: a re-emerging therapeutic target in haematological cancers. *Leukemia*. 2021;35(6):1539–51.
- 25 Donadon M, Torzilli G, Cortese N, Soldani C, Di Tommaso L, Franceschini B, et al. Macrophage morphology correlates with single-cell diversity and prognosis in colorectal liver metastasis. *J Exp Med*. 2020;217(11):e20191847.
- 26 Serrano-Gomez D, Sierra-Filardi E, Martinez-Nunez RT, Caparros E, Delgado R, Munoz-Fernandez MA, et al. Structural requirements for multimerization of the pathogen receptor dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (CD209) on the cell surface. *J Biol Chem*. 2008;283(7):3889–903.
- 27 Nagayoshi R, Nagai T, Matsushita K, Sato K, Sunahara N, Matsuda T, et al. Effectiveness of anti-folate receptor beta antibody conjugated with truncated *Pseudomonas* exotoxin in the targeting of rheumatoid arthritis synovial macrophages. *Arthritis Rheum*. 2005;52(9):2666–75.
- 28 Municio C, Soler Palacios B, Estrada-Capetillo L, Benguria A, Dopazo A, Garcia-Lorenzo E, et al. Methotrexate selectively targets human proinflammatory macrophages through a thymidylate synthase/p53 axis. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(12):2157–65.
- 29 Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med*. 1983;309(18):1094–104.
- 30 Masson E, Relling MV, Synold TW, Liu Q, Schuetz JD, Sandlund JT, et al. Accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts is a determinant of antileukemic effects in vivo. A rationale for high-dose methotrexate. *J Clin Invest*. 1996;97(1):73–80.
- 31 Lopez-Lopez E, Autry RJ, Smith C, Yang W, Paugh SW, Panetta JC, et al. Pharmacogenomics of intracellular methotrexate polyglutamates in patients' leukemia cells in vivo. *J Clin Invest*. 2020;130(12):6600–15.
- 32 Liu Y, Yin Y, Sheng Q, Lu X, Wang F, Lin Z, et al. Association of ABC2-24C>T polymorphism with high-dose methotrexate plasma concentrations and toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 2014;9(1):e82681.
- 33 Cuevas VD, Simon-Fuentes M, Orta-Zavalza E, Samaniego R, Sanchez-Mateos P, Escribese M, et al. The gene signature of activated M-CSF-primed human monocyte-derived macrophages is IL-10-dependent. *J Innate Immun*. 2022;14(3):243–56.
- 34 Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol*. 2016;17(10):1142–9.
- 35 Kim H. The transcription factor MafB promotes anti-inflammatory M2 polarization and cholesterol efflux in macrophages. *Sci Rep*. 2017;7(1):7591.
- 36 Kang K, Park SH, Chen J, Qiao Y, Gianpoulou E, Berg K, et al. Interferon-gamma represses M2 gene expression in human macrophages by disassembling enhancers bound by the transcription factor MAF. *Immunity*. 2017;47(2):235–50.e4.
- 37 Cuevas VD, Anta L, Samaniego R, Orta-Zavalza E, Vladimir de la Rosa J, Baujat G, et al. MAFB determines human macrophage anti-inflammatory polarization: relevance for the pathogenic mechanisms operating in multicentric carpotarsal osteolysis. *J Immunol*. 2017;198(5):2070–81.
- 38 Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):533–44.
- 39 Liu M, Tong Z, Ding C, Luo F, Wu S, Wu C, et al. Transcription factor c-Maf is a checkpoint that programs macrophages in lung cancer. *J Clin Invest*. 2020;130(4):2081–96.
- 40 Vega MA, Simon-Fuentes M, Gonzalez de la Aleja A, Nieto C, Colmenares M, Herrero C, et al. MAFB and MAF transcription factors as macrophage checkpoints for COVID-19 severity. *Front Immunol*. 2020;11:603507.
- 41 Pittet MJ, Michielin O, Migliorini D. Clinical relevance of tumour-associated macrophages. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19(6):402–21.
- 42 Eychene A, Rocques N, Pouponnot C. A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(9):683–93.
- 43 Niceta M, Stellacci E, Gripp KW, Zampino G, Kousi M, Anselmi M, et al. Mutations impairing GSK3-mediated MAF phosphorylation cause cataract, deafness, intellectual disability, seizures, and a down syndrome-like facies. *Am J Human Genet*. 2015;96(5):816–25.
- 44 Meijer L, Flajole M, Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(9):471–80.
- 45 Rossi G, Alama A, Genova C, Rijavec E, Tagliamento M, Biello F, et al. The evolving role of pemetrexed disodium for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2018;19(17):1969–76.
- 46 Municio C, Dominguez-Soto A, Fuentelsaz-Romero S, Lamana A, Montes N, Cuevas VD, et al. Methotrexate limits inflammation through an A20-dependent cross-tolerance mechanism. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(5):752–9.
- 47 Zhang F, Mears JR, Shakib L, Beynor JJ, Shanaj S, Korsunsky I, et al. IFN-gamma and TNF-alpha drive a CXCL10+ CCL2+ macrophage phenotype expanded in severe COVID-19 lungs and inflammatory diseases with tissue inflammation. *Genome Med*. 2021;13(1):64.
- 48 Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018;24(5):541–50.
- 49 Chen Y, Jin H, Song Y, Huang T, Cao J, Tang Q, et al. Targeting tumor-associated macrophages: a potential treatment for solid tumors. *J Cell Physiol*. 2021;236(5):3445–65.
- 50 Dong Y, Wan Z, Gao X, Yang G, Liu L. Reprogramming immune cells for enhanced cancer immunotherapy: targets and strategies. *Front Immunol*. 2021;12:609762.
- 51 Petty AJ, Owen DH, Yang Y, Huang X. Targeting tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy. *Cancers*. 2021;13(21):5318.
- 52 Ricketts TD, Prieto-Dominguez N, Gowda PS, Ubil E. Mechanisms of macrophage plasticity in the tumor environment: manipulating activation state to improve outcomes. *Front Immunol*. 2021;12:642285.
- 53 Zhao C, Pang X, Yang Z, Wang S, Deng H, Chen X. Nanomaterials targeting tumor-associated macrophages for cancer immunotherapy. *J Control Release*. 2022;341:272–84.

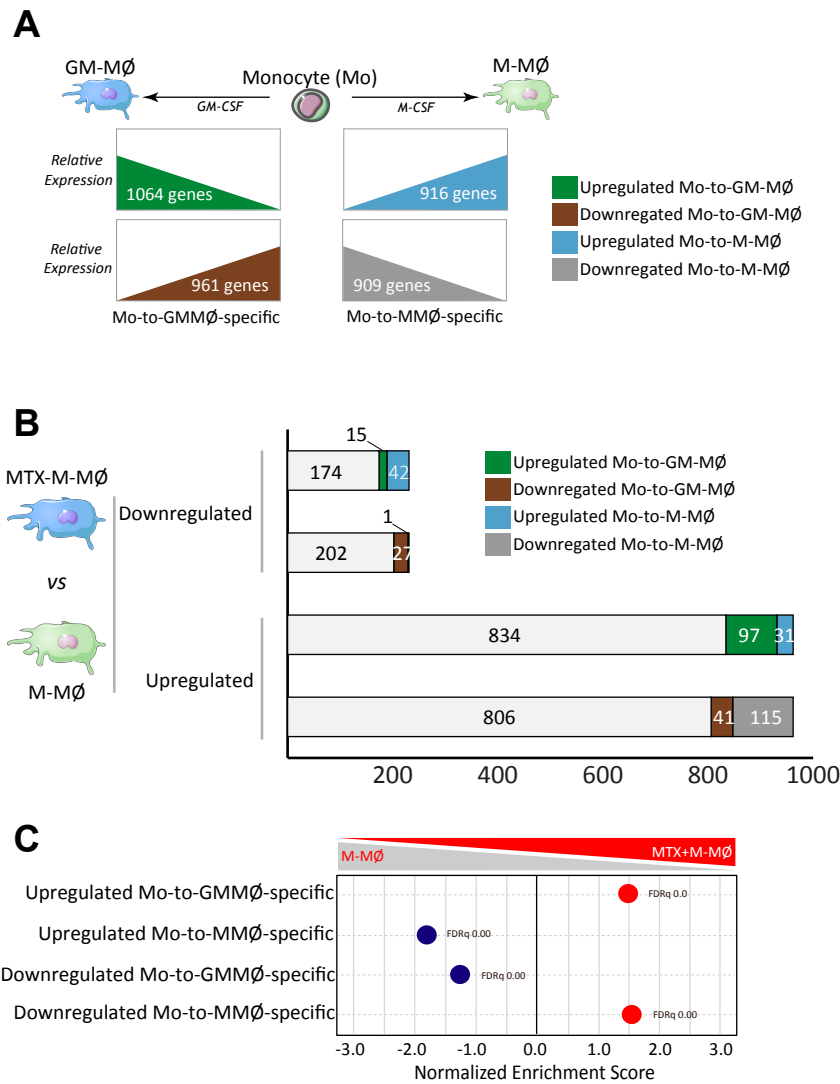
- 54 Nishida-Aoki N, Gujral TS. Polypharmacological reprogramming of tumor-associated macrophages towards an inflammatory phenotype. *Cancer Res*. 2021;82(3):433–46.
- 55 Xu L, Xie X, Luo Y. The role of macrophage in regulating tumour microenvironment and the strategies for reprogramming tumour-associated macrophages in antitumour therapy. *Eur J Cell Biol*. 2021;100(2):151153.
- 56 Cheng N, Bai X, Shu Y, Ahmad O, Shen P. Targeting tumor-associated macrophages as an antitumor strategy. *Biochem Pharmacol*. 2021;183:114354.
- 57 Kumari A, Silakari O, Singh RK. Recent advances in colony stimulating factor-1 receptor/c-FMS as an emerging target for various therapeutic implications. *Biomed Pharmacother*. 2018;103:662–79.
- 58 Conejo-Garcia JR, Rodriguez PC. c-Maf: a bad influence in the education of macrophages. *J Clin Invest*. 2020;130(4):1629–31.
- 59 Cao S, Liu J, Song L, Ma X. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J Immunol*. 2005;174(6):3484–92.
- 60 Sierra-Filardi E, Puig-Kroger A, Blanco FJ, Nieto C, Bragado R, Palomero MI, et al. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood*. 2011;117(19):5092–101.
- 61 Gonzalez-Dominguez E, Dominguez-Soto A, Nieto C, Flores-Sevilla JL, Pacheco-Blanco M, Campos-Pena V, et al. Atypical activin A and IL-10 production impairs human CD16+ monocyte differentiation into anti-inflammatory macrophages. *J Immunol*. 2016;196(3):1327–37.
- 62 Schaer DA, Geeganage S, Amaladas N, Lu ZH, Rasmussen ER, Sonyi A, et al. The folate pathway inhibitor pemetrexed pleiotropically enhances effects of cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2019;25(23):7175–88.

Supplementary Figure 1



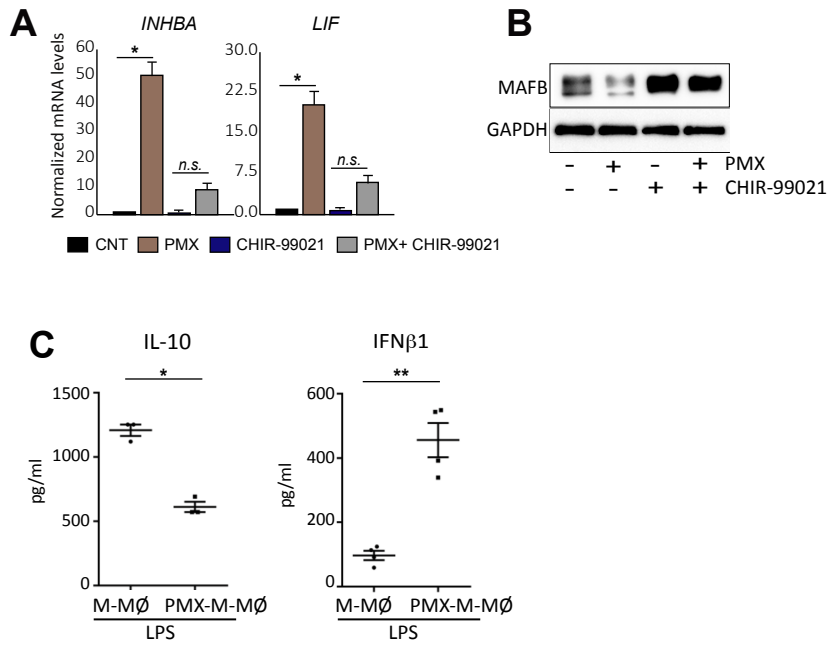
Supplementary Figure 1.- Folinic acid (FA) modulates the expression of MTX-response genes in MTX treated-M-MØ. (A) Gene expression of the indicated genes determined by qRT-PCR. Monocytes were untreated (CNT), exposed to MTX (5uM), folinic acid (500 uM) or MTX+FA at the beginning of the 7-day macrophage differentiation process with M-CSF and the RNA levels were determined at day 7 on M-MØ. Mean \pm SEM of 3 independent donors are shown. Groups were compared by applying one-way ANOVA (with Tukey's post hoc test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). **(B)** Relative level of expression of the indicated genes as determined by RNA-sequencing on M-MØ and MTX-M-MØ (GSE186151).

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2.- Expression of MTX-regulated genes along monocyte to macrophage differentiation (A) Schematic representation of the genes specifically upregulated or downregulated along the monocyte-to-M-M ϕ differentiation and monocyte-to-GM-M ϕ differentiation ($\log_2FC > 1$; $adjp < 0.05$) (GSE188278). **(B)** Comparison of downregulated or upregulated genes in M-M ϕ or MTX-M-M ϕ with the genes whose expression is upregulated or downregulated along the monocyte-to-M-M ϕ differentiation and monocyte-to-GM-M ϕ differentiation. **(C)** GSEA on the ranked comparison of the transcriptome of MTX-M-M ϕ versus untreated M-M ϕ , using the genes significantly modulated along the monocyte-to-M-M ϕ differentiation and monocyte-to-GM-M ϕ differentiation as data set. False discovery rate (FDRq) are indicated (red, positive enrichment; blue, negative enrichment). The genes within the leading edge of each GSEA are indicated in Supplementary Table 1.

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3.- GSK3 β inhibition modulates the expression of *INHBA*, *LIF* mRNA and *MAFB* in Pemetrexed (PMX) treated-M-MØ. (A) Gene expression of the indicated genes determined by qRT-PCR on M-MØ and PMX-M-MØ (d5). PMX and CHIR-99021 was added on day 5 and gene expression determined at day 7. Mean \pm SEM of 4 independent donors are shown. Groups were compared by applying one-way ANOVA (with Tukey's post hoc test, * p <0.05). **(B)** Immunoblot analysis of *MAFB* by M-MØ and PMX-M-MØ (d5) unexposed or exposed to CHIR-99021. GAPDH protein levels were determined as protein loading control. **(C)** Production of *IL-10* and *IFN β 1* by M-MØ and PMX-M-MØ challenged with LPS for 3h, as determined by ELISA. Mean \pm SEM of 4 independent donors, each symbol represents a single donor (*, p <0.05, **, p <0.01, paired t-test).

La reprogramación de macrófagos por inhibidores de JAK depende de MAFB

Los macrófagos derivados de monocitos desempeñan un papel patogénico clave en las enfermedades inflamatorias. En el caso de la artritis reumatoide (RA), la presencia de subpoblaciones específicas de macrófagos infiltrados en el tejido sinovial se asocia tanto con la enfermedad activa como con la resolución de la inflamación. Los inhibidores de JAK (JAKi) son los primeros fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintéticos dirigidos (tsDMARD) aprobados para el tratamiento de la RA, con una eficacia comparable a los biológicos. Sin embargo, los efectos de los JAKi sobre la especificación y diferenciación de macrófagos son actualmente desconocidos. Hemos analizado los efectos transcripcionales y funcionales de los JAKi en subpoblaciones de monocitos de sangre periférica de pacientes con RA y en la diferenciación de macrófagos derivados de monocitos promovida por el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), un factor que impulsa el desarrollo y la patogénesis de la RA. Describimos que el JAKi upadacitinib restablece el equilibrio de las subpoblaciones de monocitos en la sangre periférica de los pacientes con RA y sesga a los macrófagos hacia la adquisición de un perfil transcripcional y funcional antiinflamatorio de manera dependiente de la dosis. Los macrófagos tratados con upadacitinib mostraron un fuerte enriquecimiento positivo de los genes que definen a los macrófagos sinoviales asociados con la homeostasis/resolución de la inflamación. Específicamente, los macrófagos tratados con upadacitinib exhibieron una expresión significativamente elevada de MAFB y de los genes regulados por MAFB, una fosforilación inhibitoria elevada de GSK3 β y una mayor actividad fagocítica, y mostraron un perfil de citoquinas antiinflamatorio tras la activación por estímulos patogénicos. Estos resultados también se detectaron en los macrófagos expuestos a otros JAKi (baricitinib, tofacitinib), pero no en presencia del inhibidor de TYK2 deucravacitinib. En conjunto, nuestros resultados indican que los JAKi promueven la reprogramación de macrófagos hacia la adquisición de un perfil más antiinflamatorio/homeostático, un efecto que se correlaciona con la capacidad de los JAKi para-promover la expresión de MAFB.

López-Navarro B, Simón-Fuentes M, Ríos I, Schiaffino MT, Sanchez A, Torres-Torresano M, Nieto-Valle A, Castrejón I, Puig-Kröger A. Macrophage re-programming by JAK inhibitors relies on MAFB. *Cell Mol Life Sci.* 2024 Mar 25;81(1):152. doi: 10.1007/s00018-024-05196-1. PMID: 38528207; PMCID: PMC10963568.



Macrophage re-programming by JAK inhibitors relies on MAFB

Baltasar López-Navarro¹ · Miriam Simón-Fuentes² · Israel Ríos² · María Teresa Schiaffino¹ · Alicia Sanchez¹ ·
Mónica Torres-Torresano¹ · Alicia Nieto-Valle³ · Isabel Castrejón^{4,5} · Amaya Puig-Kröger¹

Received: 19 October 2023 / Revised: 1 March 2024 / Accepted: 2 March 2024
© The Author(s) 2024

Abstract

Monocyte-derived macrophages play a key pathogenic role in inflammatory diseases. In the case of rheumatoid arthritis (RA), the presence of specific synovial tissue-infiltrating macrophage subsets is associated with either active disease or inflammation resolution. JAK inhibitors (JAKi) are the first targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (tsDMARD) approved for treatment of RA with comparable efficacy to biologics. However, the effects of JAKi on macrophage specification and differentiation are currently unknown. We have analyzed the transcriptional and functional effects of JAKi on human peripheral blood monocyte subsets from RA patients and on the differentiation of monocyte-derived macrophages promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), a factor that drives the development and pathogenesis of RA. We now report that JAKi Upadacitinib restores the balance of peripheral blood monocyte subsets in RA patients and skewed macrophages towards the acquisition of an anti-inflammatory transcriptional and functional profile in a dose-dependent manner. Upadacitinib-treated macrophages showed a strong positive enrichment of the genes that define synovial macrophages associated to homeostasis/inflammation resolution. Specifically, Upadacitinib-treated macrophages exhibited significantly elevated expression of MAFB and MAFB-regulated genes, elevated inhibitory phosphorylation of GSK3 β , and higher phagocytic activity and showed an anti-inflammatory cytokine profile upon activation by pathogenic stimuli. These outcomes were also shared by macrophages exposed to other JAKi (baricitinib, tofacitinib), but not in the presence of the TYK2 inhibitor deucravacitinib. As a whole, our results indicate that JAKi promote macrophage re-programming towards the acquisition of a more anti-inflammatory/pro-resolution profile, an effect that correlates with the ability of JAKi to enhance MAFB expression.

Keywords GM-CSF · JAK inhibitors · Macrophages · Macrophage reprogramming · MAFB · Monocytes · Rheumatoid arthritis · Upadacitinib

Introduction

Macrophages and macrophage-derived cytokines (TNF α , IL-6 and GM-CSF) have a major pathogenic role in rheumatoid arthritis (RA). Macrophages accumulate in the synovium of RA joints, where they exhibit destructive and remodeling effects and contribute to inflammation and joint destruction [1, 2]. Several multicenter and collaborative studies using single-cell omics technology have now illustrated the heterogeneity of active RA synovial tissue macrophages [3–5] in comparison with those from patients in remission and healthy subjects. Specifically, the monocyte-derived MerTK^{neg}CD206^{neg} macrophage subset, that infiltrates the synovium and differentiates into macrophages along RA evolution, is specifically associated with RA pathology. Conversely, tissue-resident

✉ Amaya Puig-Kröger
amaya.puig@iisgm.com

¹ Unidad de Inmunometabolismo e Inflamación, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

² Myeloid Cell Laboratory, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain

³ Unidad de Microscopía Confocal, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

⁴ Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

⁵ Departamento de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

MerTK^{pos}CD206^{pos}TREM2^{pos} and FOLR2^{high}/LYVE1^{pos} subsets, identified in the lining and sublining layers, respectively, are associated with homeostasis and remission [3, 6].

GM-CSF strongly influences the development and pathogenesis of RA [7]. Indeed, GM-CSF-deficient mice fail to develop joint pathology and associated pain in inflammatory arthritis models, and blockade of GM-CSF reduces the severity of established disease in wild type mice [8]. Besides driving tissue inflammation [7–9], GM-CSF is critical for the generation of lung alveolar macrophages, and primes monocytes for differentiating into macrophages (GM-MØ) with robust activin A-dependent antigen-presenting, immuno-stimulatory and pro-inflammatory [IL10^{low}IL6^{high}] activity. Unlike GM-CSF, M-CSF is indispensable for tissue-resident and monocyte-derived macrophage differentiation [10, 11], and primes monocytes to differentiate into macrophages (M-MØ) with a MAFB-dependent anti-inflammatory, reparative and immunosuppressive profile (IL10^{high}IL6^{low}) upon stimulation [11, 12]. Our group and others have shown that M-MØ and GM-MØ exhibit unique anti-inflammatory and pro-inflammatory transcriptional profiles [13–15], and that the transcriptome of GM-MØ strongly resembles that of pathogenic macrophages in RA [16, 17]. Given the role of GM-CSF in RA, a number of clinical trials targeting GM-CSF or GM-CSFR have been carried out and shown rapid and sustained clinical responses without major safety concerns [18, 19], and inhibitors of JAK2, a major downstream signaling effector of GM-CSFR, have also shown clinical efficacy in RA [20, 21].

JAKs are a family of protein tyrosine kinases associated with the cytoplasmic domain of type I and II cytokine receptors and become activated for intracellular signaling upon receptor engagement by their cognate ligands. The four JAK isoforms (JAK1, 2, 3 and TYK2) dimerize after receptor activation, become phosphorylated and activate specific signal transducers and activators of transcription (STATs), which subsequently induce gene transcription [20, 22]. The various JAK-STAT axes transmit the intracellular signaling initiated by numerous cytokines (IL-6, IL-23) as well as all types of interferons, hormones (EPO, GH) and growth factors (GM-CSF, G-CSF) and are critically involved in homeostatic (hematopoiesis) and pathological processes (antiviral response). Importantly, JAK-dependent cytokines like IL-6 and GM-CSF are major contributors to immunopathology in RA, and the blockade of their intracellular signaling is beneficial [20, 21]. Supporting the pathological role of JAK in RA, a recent GWAS study revealed a significant association between polymorphisms in the genes of the JAK-STAT signaling pathway (*TYK2*, *STAT4*, *IL6R*) and augmented risk for seropositive RA [23]. JAK inhibitors (JAKi) have shown efficacy in the management of RA both as monotherapy and in combination

with Methotrexate (MTX), and are recommended following inadequate response to conventional or biologics treatments [24]. At present, five JAKi (Tofacitinib, Baricitinib, Filgotinib, Upadacitinib and Peficitinib) have received market approval or are undergoing clinical trials for RA treatment. Importantly, all JAKi have shown efficacy in the management of RA with comparable safety profile to other biological disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARD) in both clinical trials and real-world [22, 25].

The effects of JAKi on macrophages have been mostly explored in terms of cytokine signaling and cytokine and chemokine production in response to danger signals [26, 27]. Tofacitinib and Baricitinib prevent GM-CSF-induced JAK2/STAT5 phosphorylation in THP-1 cells, and IL-1β production by neutrophils [27], and Baricitinib suppresses the in vivo production of cytokines by lung macrophages and limit the recruitment of neutrophils to the lung in SARS-CoV-2-infected macaques [28]. However, whether JAKi affects monocyte-to-macrophage differentiation or conditions macrophage re-programming has not been explored so far. In the present manuscript, we present evidence that JAK inhibitors re-program monocyte-to-macrophage differentiation in a dose-dependent manner and via enhanced expression of MAFB.

Materials and methods

Patients and flow cytometry

A total of three patients with rheumatoid arthritis (RA) and inadequate response to DMARD receiving Upadacitinib as indicated by the treating rheumatologist were invited to participate in this study. Nine normal donors with a mean (SD) age of 52 (11) years were also invited. Informed consent was obtained from these participants and the study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethical Committee of Hospital General Universitario Gregorio Marañón (protocol code: JAKi-2022-v1 and ESCL_REUINM_2023). The three patients with seropositive RA were female with a mean (SD) age of 45 (15) years and moderate disease activity before initiating Upadacitinib treatment (rinvoq 15 mg daily) with a mean (SD) CRP based Disease Activity Score 28-joint counts (DAS28-CRP) of 4.1 (0.7). The three patients showed improvement at three months follow-up with a mean (SD) DAS28-CRP of 1.1 (0.2). A more detailed patient description is presented in Supplementary file. Blood was obtained in K₂-EDTA tubes before and three months after Upadacitinib treatment. 100 µl of whole blood was labeled for 30 min. at 4 °C with the following antibodies obtained from Beckman Coulter CD45-Krome Orange (J33), CD14-PC7 (RM052), CD16-FITC (3G8), HLA-DR

APCA750 (Immu-357). Following surface staining, cells were treated in BD Pharm Lyse (BD Biosciences) and IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter) according to the manufacturer's instructions. Viability was determined with 7-aminoactinomycin D (7-AAD Viability Dye, Beckman Coulter) staining, and flow cytometry analysis performed using CytoFLEX S and Kaluza Analysis 2.1 software (Beckman Coulter). Monocyte subsets were gated on the basis of forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) and CD14/CD16/HLA-DR expression as described in Supplementary Fig. 1.

Cell culture

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from buffy coats from normal donors over a Lymphoprep (Nycomed Pharma) gradient. Monocytes were purified from PBMC by magnetic cell sorting using CD14 microbeads (Miltenyi Biotech). Monocytes were cultured at 0.5×10^6 cells/ml for 7 days in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, and containing GM-CSF (1000 U/ml, ImmunoTools) to generate GM-CSF-polarized macrophages (GM-MØ) or M-CSF (20 ng/ml, ImmunoTools) to generate M-CSF-polarized macrophages (M-MØ). GM-CSF or M-CSF were added every two days. Based on the dosage and scheduled regime treatment of JAKi in RA patients (daily oral ingestion), Baricitinib and Upadacitinib (10–100 nM, Selleckchem) were added once-a-day during the 7-day differentiation procedure. The concentrations were selected based on enzyme assays (JAK2 IC₅₀ = 5.7 nM for Baricitinib and JAK2 IC₅₀ = 109 nM for Upadacitinib) and in vivo dosage [29]. In some experiments, JAKi were added to mature macrophages (on day 5 of the differentiation protocol, short-term treatment). Upadacitinib and Baricitinib were dissolved in fresh DMSO at 10 mM initial concentration, and control experiments were done by exposing macrophages to the same amount of DMSO (final concentration 0.001%). Viability of the resultant cell culture was assessed with 7-AAD staining. STAT5-IN-1 (50 µM, STAT5 phosphorylation specific inhibitor, Selleckchem) and U0126 (2.5 µM, MEK1/2 inhibitor, Selleckchem) were added to monocytes together with GM-CSF once-a-day during 2-days. LPS (10 ng/ml, 0111:B4 strain, Invivogen) was added at the indicated time points onto 7-day fully differentiated macrophages.

RNAseq and GSEA

Total RNA was isolated from three independent preparations and processed at BGI (<https://www.bgitechsolutions.com>), where library preparation, fragmentation and sequencing were performed using the BGISEQ-500 platform. An

average of 5.41 Gb bases were generated per sample and, after filtering, clean reads were mapped to the reference (UCSC Genome assembly hg38) using Bowtie2 (average mapping ratio 93.41%). Gene expression levels were calculated by using the RSEM software package. Differential gene expression was assessed by using DESeq2 algorithms using the parameters Fold change > 2 and adj *p* < 0.05. For gene set enrichment analysis (GSEA) [30], the gene sets available at the website, as well as gene sets generated from publicly available transcriptional studies, were used. The datasets used throughout the study are listed and described in Supplementary Table S1. The data reported in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE232044 (Upadacitinib-treated GM-MØ) and GSE253495 (Monocytes from Upadacitinib-treated RA patients). The prediction of transcription factor activities (DoRothEA) was done in R v4.2.0 with the packages Discriminant Regulon Expression Analysis [31], limma and BiocParallel. Principal Component Analysis (PCA) on the RNAseq from macrophages was preprocessed using the rlog function for normalization of read counts in R v4.2.0.

Small interfering ribonucleic acid (siRNA) transfection

Monocytes (1×10^6 cells) were transfected with human MAFB-specific siRNA (siGENOME siRNA SMARTpool, 25 nM) (Dharmacon) using Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (ThermoFisher). Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA (25 nM) (Dharmacon) was used as negative control siRNA. Six hours after transfection, cells were allowed to recover from transfection in complete medium, exposed to Upadacitinib (100 nM) for 42 additional hours, and lysed. Knock-down of MAFB was confirmed by Western blot.

Quantitative real time RT-PCR

Total RNA was retrotranscribed and cDNA was quantified using the Universal Human Probe Roche library (Roche Diagnostics). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed on a LightCycler® 480 (Roche Diagnostics). Assays were made in triplicates and results normalized according to the expression levels of TBP. Results were obtained using the $\Delta\Delta$ CT method for quantitation. The oligonucleotides used to quantify mRNA transcripts were (5'–3'): LGMN forward: gaacaccaatgatctggagga; LGMN reverse: ggagacgatcttacgactga; CD163 forward: gaagatgctggcgtgacat; CD163 reverse: gctgcctccaccttaagtc; CMKLR1 forward: cttgatgggagcgtgac; CMKLR1 reverse: accgtaactgatggaagtgtt; FOLR2 forward:

gagagaggccaactcagacac; FOLR2 reverse: ccagaccatgtctttctgtcc; MS4A6A forward: cggactgct atacagccaaag; MS4A6A reverse: tccagcagagtgc aaatcag; IL10 forward: tctactcatggctttgtagatgc; IL10 reverse: gtggagcaggtgaagaatgc; TBP forward: cggctgtttaacttcgcttc; TBP reverse: cacacgccaagaacagtga.

ELISA

Supernatants from GM-MØ were tested for the presence of IL-10, TNF α , IL-6 (Biolegend), activin A and LGMN (R&D Systems) and L-Lactate (Abcam) following the procedures supplied by the manufacturers.

Phagocytosis

Phagocytosis ability was assessed by flow cytometry using pHrodo Red E. coli BioParticles Conjugates (Thermo Fisher), following the procedures recommended by the manufacturer. Macrophages were cultured in 24-well plate and exposed to pHrodo bioparticles for 60 min at 37 °C/5% CO₂. Cells were then harvested and assessed by flow cytometry.

Preparation of apoptotic cells and efferocytosis

Jurkat cells were cultured in RPMI 1640 medium without FCS for 16 h, and then treated with staurosporine (0.5 μ g/ml, SIGMA), followed by an incubation at 37 °C for 3 h. Staurosporine treatment yielded a population of 83% annexin V + cells. Apoptotic cells (AC) were resuspended at a concentration of 1×10^6 cells/ml and labeled with CellTrace™ Violet reagent (0.5 μ M, Invitrogen, Thermo Scientific) for 20 min. For efferocytosis, macrophages were cultured with labeled AC (ratio 1:4) in p24 plates during 1 h at 37 °C. After 1 h, macrophages were rinsed with PBS to remove unbound AC and detached with PBS 5 mM EDTA, pelleted by centrifugation and fixed (IOtest 3 Fixative Solution, Beckman Coulter) before analyzing by flow cytometry.

Video microscopy

Macrophages were seeded and cultured overnight in a collagen-coated surface (6 μ g/ml, STEMCELL), and Jurkat cells (apoptotic or alive) previously labeled with CellTrace™ Violet (0.5 μ M) were added to the culture at a proportion of 1:4 (macrophage:Jurkat) to image the efferocytosis process. Cells were live-imaged in a controlled stage at 37 °C and 5% CO₂ with a sCMOS Orca Flash digital camera (Hamamatsu) coupled to a DMi8 microscope (Leica) for 2 h.

Western-blot

Cell lysates were obtained in RIPA buffer containing 1 mM PIC (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA), 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ and 0.5 mM DTT. 10–30 μ g cell lysate was subjected to SDS-PAGE and transferred onto an Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). For folate receptor beta (FOLR2), cell lysates were subjected to SDS-PAGE under non-reduced conditions. Protein detection was carried out using rabbit antibodies against pp38 and pERK (clones D3F9 and D13.14.4E, Cell Signaling, 1/1000), MAFB (HPA005653, Santa Cruz, 1/1000), pGSK3 β (clone D85E12, Cell Signaling, 1/1000) and mouse monoclonal antibody against human CD163 (clone EDHu-1, Bio-Rad, 1/1000), pSTAT5 (clone 8-5-2, Millipore, 1/1000), FOLR2 (FR β , kindly provided by Dr. Takami Matsuyama [32], dilution 1/800). Protein loading was normalized using an antibody against GAPDH (6C5, Santa Cruz Biotechnology, 1/2000) or against human vinculin (clone VIN-11-5, Sigma-Aldrich, 1/3000).

Measurement of cellular respiration and extracellular acidification (bioenergetic profile)

The XF24 extracellular flux analyzer (Seahorse Biosciences, North Billerica, MA) was used to determine the bioenergetic profile of intact cells. Briefly, cells were seeded (200,000 cells/well) in XF24 plates (Seahorse Biosciences) and allowed to recover for 24 h. Cells were then incubated in bicarbonate-free DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 11 mM glucose, 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate, and 2% FBS in a CO₂-free incubator for 1 h. The oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR), a proxy for lactate production, were recorded to assess the mitochondrial respiratory activity and glycolytic activity, respectively. After four measurements under basal conditions, cells were treated sequentially with 1 mM oligomycin, 0.6 mM carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), 0.4 mM FCCP, and 0.5 mM rotenone plus 0.5 mM antimycin A (Sigma-Aldrich), with three consecutive determinations under each condition that were subsequently averaged. Basal respiration was estimated from the difference between the last rate measurement before first injection and the non-mitochondrial respiration rate. Non-mitochondrial respiration (OCR value after rotenone plus antimycin A addition) was subtracted from all OCR measurements. ATP turnover was estimated from the difference between the basal respiration and the oligomycin-inhibited respiration, and the maximal respiratory capacity was the rate in the presence of the uncoupler FCCP. In the case of ECAR parameters, the glycolysis capacity was obtained from the difference between the basal respiration and the oligomycin-inhibited respiration. The maximal

glycolysis capacity was estimated from the average of the oligomycin-inhibited respiration. Six independent replicas of each analysis were done, and results were normalized to 1 μ g of protein.

Statistical analysis

Statistical analysis was done using GraphPad Prism, using parametric Student's *t* test, as appropriate, and one-way ANOVA test coupled with Tukey's post hoc test where indicated. Two-sided *p* value < 0.05 was considered significant (**p* < 0.05; ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

Results

Upadacitinib re-establishes the balance of peripheral blood monocyte subsets in RA

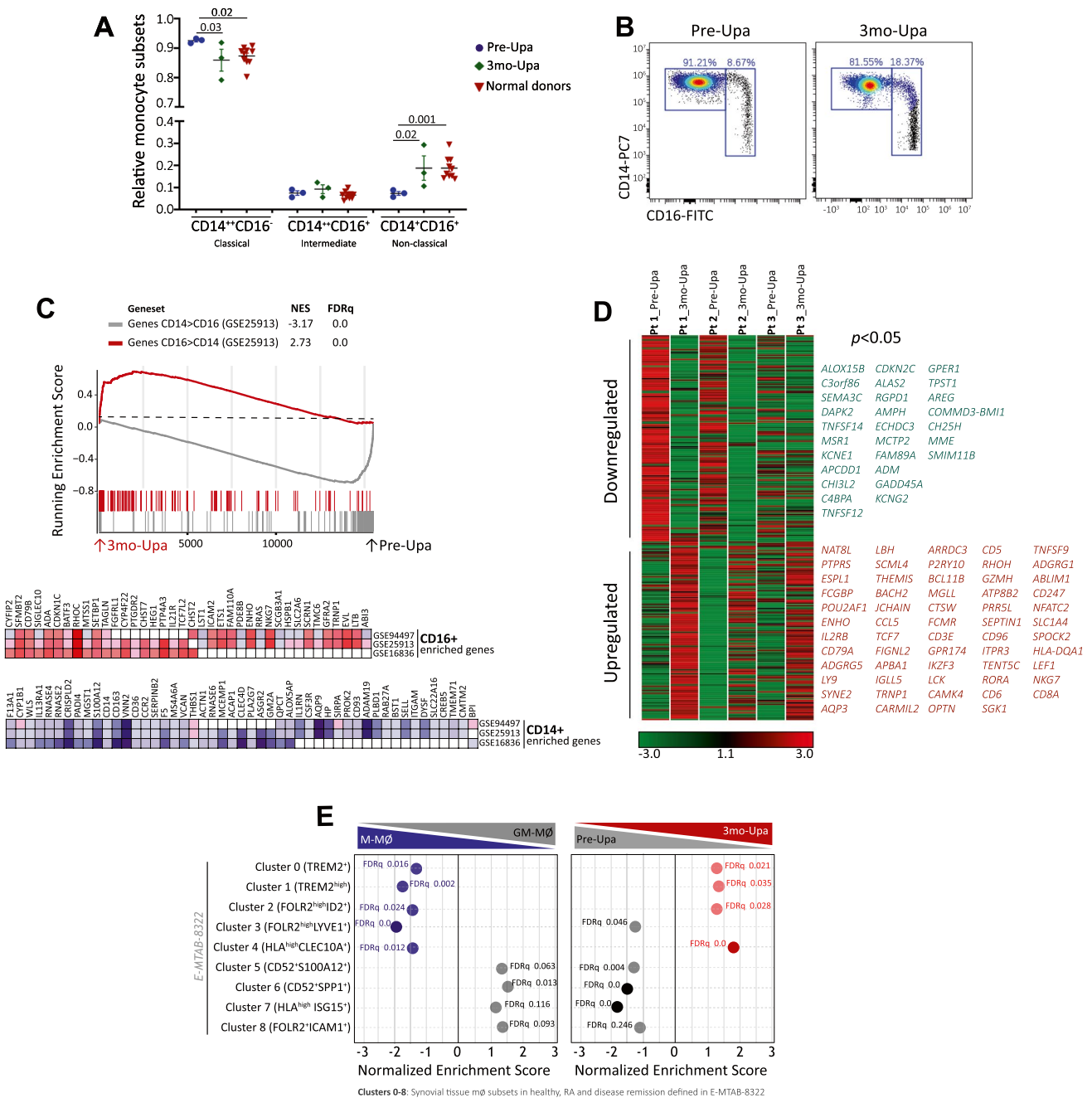
To assess whether JAK inhibitors (JAKi) had an effect on myeloid cells in RA patients, we initially determine the relative levels of monocyte subsets in peripheral blood before and after a 3-month period of Upadacitinib (Upa) treatment. Analysis of 3 independent RA patients showed that Upa treatment results in significantly diminished levels of the classical CD14⁺CD16⁻ monocyte subset and an augmented proportion of non-classical CD14⁺CD16⁺ monocytes (Fig. 1A–B and Supplementary Fig. 1). Moreover, after three months of treatment, monocyte subsets levels of RA patients were similar to those found in normal donors (Fig. 1A). Since reduction of the non-classical CD14⁺CD16⁺ monocyte subset characterizes peripheral blood from active RA patients [33], these results indicate that Upa restores the balance of monocyte subsets found in healthy individuals, a finding that agrees with the known therapeutic action of JAKi (Fig. 1A–B). Transcriptomic analysis of CD14⁺ monocytes isolated from RA patients before (Pre-Upa) and 3 months along Upa treatment (3mo-Upa) further confirmed these phenotypic changes. GSEA revealed that the transcriptome of 3mo-Upa has a very significant over-representation of the genes that define non-classical (CD16⁺) monocytes as well as a significantly reduced expression of the genes that define classical (CD14⁺) monocytes, using the genesets previously defined GSE25913 [34], GSE94497 [35], and GSE16836 [36] (Fig. 1C). In fact, leading edge analysis evidenced that, besides CD16 (*FCGR3A*), Upadacitinib upregulates numerous other genes that characterize CD16⁺ monocytes, including *RHOC* and *ADA*. Conversely, Upadacitinib downregulates not only paradigmatic CD14⁺ monocyte marker genes (*CD14*, *CCR2*) but also genes whose expression characterizes CD14⁺ classical monocytes (*VNN2*, *S100A12*, *SERPINB2*) (Fig. 1C). Specifically,

comparison of the transcriptome of Pre-Upa and 3mo-Upa indicated the existence of 149 genes whose expression is significantly (*p* < 0.05) diminished by Upa treatment, including STAT-dependent genes like *PIM1*, *IFIT1* and *RSAD2* [35, 37, 38] (Fig. 1D, Supplementary Table S1). On the other hand, the 129 genes whose expression is augmented upon Upa treatment included several genes associated to anti-inflammatory functions like *CD28* and *CD127* [39, 40] (Fig. 1D, Supplementary Table S1). Altogether, these findings indicate that JAKi influence monocyte differentiation at the phenotypic and transcriptional level.

JAKi ameliorate the signs and symptoms of RA and are currently used for the treatment of RA [20, 21]. Recent research has shed light on the transcriptome of subsets of synovial tissue macrophages (STMs) across various states: in healthy subjects, RA patients, and those in RA remission [3]. In light of this, we investigated the impact of Upa on the expression of gene clusters defining distinct STM subsets. Notably, the gene clusters that define the four pathogenic macrophage subsets in RA, and whose transcriptome resembles that of GM-MØ (Clusters 5–8, Fig. 1E), were extremely responsive to Upa treatment, as their expression was significantly diminished in 3mo-Upa (Fig. 1E). Conversely, the expression of the gene clusters that define four of the five STM subsets associated to homeostasis and/or remission (Clusters 0–4, Fig. 1E), which exhibit a transcriptome akin to anti-inflammatory M-MØ, were increased in 3mo-Upa (Fig. 1E). As a whole, treatment with Upa causes CD14⁺ monocytes from RA patients to exhibit reduced expression of genes associated to pathogenic STM subsets, and, concurrently, to acquire the expression of genes characterizing macrophages from RA patients in remission. These observations align well with the established therapeutic action of JAKi.

Upadacitinib promotes the generation of monocyte-derived macrophages with an anti-inflammatory transcriptional and functional profile

The phenotypic and transcriptional effects of Upa treatment on human peripheral blood monocytes led us to hypothesize that JAKi might also modify the differentiation of monocyte-derived macrophages, which drive pathogenesis in most inflammatory diseases [41]. To directly address this hypothesis, we evaluated the effect of JAKi on the differentiation of monocyte-derived macrophages in response to GM-CSF, a major pathogenic cytokine in RA [7, 10]. To that end, 10 nM or 100 nM Upadacitinib (Upa) was added each day along the GM-CSF-dependent monocyte-to macrophage (GM-MØ) differentiation process to generate 10Upa-GM-MØ or 100Upa-GM-MØ (Fig. 2A). These Upa concentrations, which fall within the range of



Upa levels found in Upa-treated RA patients [29], had no effect on macrophage viability (Supplementary Fig. 2A), and drastically impaired the GM-CSF-induced JAK2-dependent STAT5 and ERK phosphorylation in monocytes [42] (Fig. 2A). RNAseq revealed that 100 nM Upa not only reduces the expression of STAT5-dependent genes like *CISH* and *PIM1* [37, 38] (Supplementary Fig. 2B) but promotes a huge shift in the GM-MØ transcriptional profile. Specifically, 100Upa-GM-MØ exhibited significantly ($\log_2FC > 1$; $adjp < 0.05$) altered expression of 859 genes (347 genes upregulated, 512 genes downregulated)

compared to control GM-MØ (Fig. 2B, C), whereas 10Upa-GM-MØ only showed 90 differentially expressed genes (Fig. 2B). Therefore, long-term Upa treatment modifies the acquisition of the transcriptional profile of GM-CSF-dependent monocyte-derived macrophages in a dose-dependent manner (Fig. 2B, D), an effect that concurs with its dose-dependent ability to inhibit the GM-CSF-induced intracellular signaling (Supplementary Fig. 2C). Importantly, gene ontology analysis of the transcriptome of 10Upa-GM-MØ and 100Upa-GM-MØ revealed that the presence of Upa significantly ($FDRq = 0.0$) diminishes the

Fig. 1 Upadacitinib re-establishes the balance of monocyte subsets in circulation **A** Relative frequency of monocyte subsets in three rheumatoid arthritis (RA) patients before (Pre-Upa) and three months after Upadacitinib treatment (3mo-Upa) and in nine normal donors sex-matched (p values are indicated, linear mixed models were used to examine monocyte subset changes between Pre-Upa vs 3mo-Upa; student's t-test for independent groups was used to detect monocyte subset changes in Pre-Upa and 3mo-Upa compared to normal donors). **B** A representative plot of CD14 and CD16 expression in one RA patient before and three months after Upadacitinib treatment. **C** GSEA on the ranked comparison of the 3 month Upadacitinib (3mo-Upa) treated versus pre-treated (Pre-Upa) monocyte transcriptomes, using the genes significantly overexpressed in CD16+ and in CD14+ monocytes (GSE25913) as data set. Normalized Enrichment Score (NES) and False Discovery Rate (FDRq) are indicated. Leading edge analysis of the GSEA of the genes that define the CD16+ or CD14+ monocyte subsets (GSE94497, GSE25913, GSE16836) on the ranked comparison of the transcriptomes of 3mo-Upa versus Pre-Upa monocytes is shown in the bottom panel. In the heatmap, expression values are represented as colors, where the range of colors (red, pink, light blue, dark blue) shows the range of expression values (high, moderate, low, lowest). **D** Heatmap of the expression of genes significantly ($p < 0.05$) altered by Upa treatment. For each gene, mRNA expression level is represented after normalizing gene expression and k-means clustering using Genesis (<http://genome.tugraz.at/genesisclient/>). The group of genes whose expression is either up-regulated or down-regulated by 25% after Upadacitinib treatment in the three patients is shown. **E** GSEA on the ranked comparison of the GM-M \emptyset versus M-M \emptyset transcriptomes (left) and the ranked comparison of the 3 month upadacitinib (3mo-Upa) treated versus pre-treated (Pre-Upa) monocyte transcriptomes (right), using the genes preferentially expressed by RA-specific clusters of synovial tissue macrophage (E-MTAB-8322) as data set. NES and FDRq value are indicated (FDRq < 0.01, dark filled circle; FDRq > 0.250, empty circle). The intensity of color increases with the enrichment of the gene signature

expression of the pro-inflammatory “GM-M \emptyset -specific” gene set (GSE188278) [43] (Fig. 2E), which includes genes like *INHBA* (Fig. 2F), and reduces the production of *INHBA*-encoded activin A (Fig. 2G), whose expression is particularly high in synovial macrophages from RA patients [16, 17]. Therefore, Upadacitinib weakens the expression of genes that characterize GM-CSF-dependent pro-inflammatory macrophages.

Noteworthy, GSEA revealed an additional and unexpected effect of Upadacitinib, as the transcriptome of 10Upa-GM-M \emptyset and 100Upa-GM-M \emptyset exhibited a very significant over-representation of the genes that define anti-inflammatory monocyte-derived macrophages, namely, the M-CSF-dependent “M-M \emptyset -specific” gene set (GSE188278) [43] (Fig. 2E), including *IL10*, *LGMN*, *CD163* and *FOLR2* (Fig. 2F, Supplementary Fig. 2D). Moreover, this anti-inflammatory effect of Upadacitinib was evident at the protein level, since Upa-treated macrophages had increased expression of IL-10, Legumain (LGMN), CD163 and FOLR2 (Fig. 2G, H). When compared to control GM-M \emptyset , 100Upa-GM-M \emptyset exhibited higher phagocytic activity and, higher levels of IL-10 and lower production of TNF α and

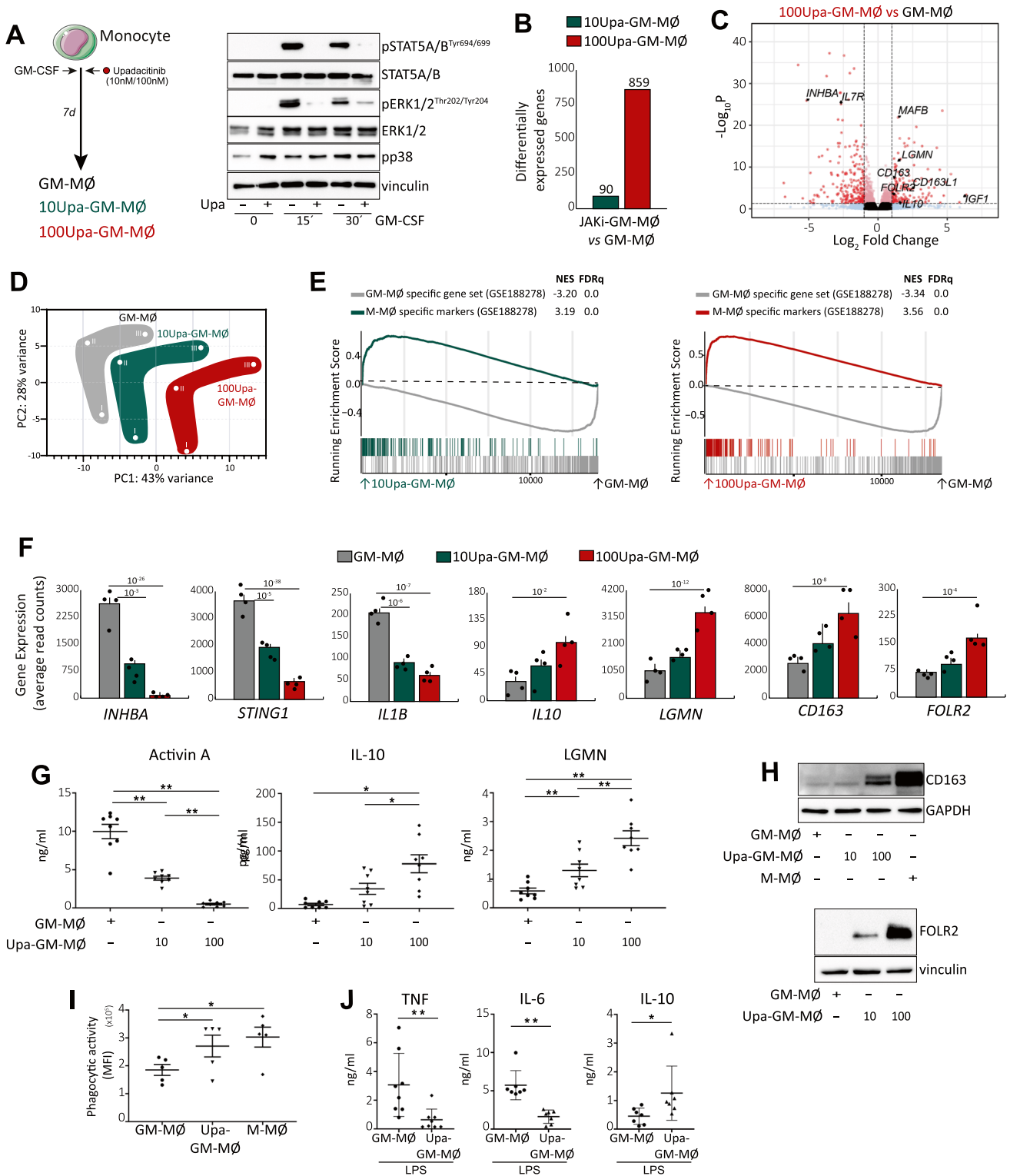
IL-6 after exposure to LPS (Fig. 2I, J) (Supplementary Fig. 2E). All these results demonstrate that Upadacitinib not only limits the pro-inflammatory nature of GM-CSF-dependent monocyte-derived macrophages, but prompts the acquisition of anti-inflammatory features. Since the effect of Upa resembles the pro-differentiation action of M-CSF on monocytes (Fig. 2E–H), we also checked whether Upa modifies the expression of genes specifically regulated during monocyte-to-M-M \emptyset differentiation (GSE188278). As shown in Fig. 3A, the genes exclusively upregulated along monocyte-to-M-M \emptyset differentiation (“M-M \emptyset >> Monocytes”) were significantly over-expressed in 100Upa-GM-M \emptyset , whose transcriptome also showed a reduced expression of the genes exclusively downregulated along monocyte-to-M-M \emptyset (“Monocytes >> M-M \emptyset ”, Fig. 3A). These results confirm the link between Upadacitinib and M-CSF-driven responses, and suggests that Upadacitinib re-programs macrophages at the transcriptional and functional level.

The effect of upadacitinib on monocyte differentiation is dose-dependent

As 10Upa-GM-M \emptyset and 100Upa-GM-M \emptyset showed different protein levels of FOLR2, CD163, Legumain and IL-10 (Fig. 2G–H), we assessed whether the transcriptional effect of Upa on macrophages was dose dependent. Comparison of the gene profile of 10Upa-GM-M \emptyset and 100Upa-GM-M \emptyset identified 81 differentially expressed genes (Fig. 3B). Of note, 70% of the genes with higher expression in 100Upa-GM-M \emptyset (14 out of 20) belong to the “M-M \emptyset -specific” gene set, while 59% of the genes with higher expression in 10Upa-GM-M \emptyset (36 out of 61) belong to the pro-inflammatory “GM-M \emptyset -specific” gene set (Fig. 3C). Therefore, long-term Upadacitinib treatment dose-dependently allows for the acquisition of an M-CSF-dependent profile (Fig. 3D).

Upadacitinib modulates the expression of genes that define macrophage subsets relevant in RA and tissue-resident macrophages

Since previous results have identified a set of genes preferentially expressed by macrophages from the synovium of RA patients (RAM \emptyset) (GSE10500) [44], we next checked whether Upa affects the expression of genes preferentially expressed by RAM \emptyset . GSEA revealed that RAM \emptyset -specific genes are under-represented in the transcriptome of both 10Upa-GM-M \emptyset and 100Upa-GM-M \emptyset (Fig. 4A), thus indicating the inhibitory effect of Upadacitinib on the expression of genes that characterize pathogenic macrophages in RA. We also took advantage of recently published information on synovial tissue macrophage (STM) from RA patients [3], and analyzed the expression of gene



clusters that are specific for the distinct STM subsets in 100Upa-GM-MØ. The gene profile of 100Upa-GM-MØ showed an over-representation of the genes that define the homeostatic STM MERTK^{POS} TREM2^{high} and FOLR2^{high}/LYVE1^{POS} subsets, and also the tissue-infiltrating antigen

presenting HLA^{high}/CLEC10A^{POS} subset (Fig. 4A) [3, 6]. Reinforcing their homeostatic profile, TREM2^{high} and FOLR2^{high}/LYVE1^{POS} subsets very significantly overexpress the gene sets that define anti-inflammatory/reparative M-MØ (Fig. 1E). Of note, and although to a lower

Fig. 2 Upadacitinib promotes monocyte-derived macrophages with an anti-inflammatory gene expression and functional profile

A Schematic representation of the experiments. Monocytes were exposed to 10–100 nM Upadacitinib daily during macrophage differentiation process with GM-CSF and the RNA levels were determined at day 7 on GM-MØ, 10Upa-GM-MØ and 100Upa-GM-MØ. Right, immunoblot analysis of pSTAT5, STAT5, pERK, ERK and pp38 by monocytes treated for 1 h to 100 nM Upadacitinib (Upa) and exposed to GM-CSF for the indicated time points.

B Number of annotated genes whose expression is regulated in GM-MØ after 7d of Upadacitinib treatment ($adjp < 0.05$). **C** Volcano plot of RNAseq results showing the 100 nM Upadacitinib-induced gene expression changes in GM-MØ. **D** PCA analysis of GM-MØ, 10Upa-GM-MØ and 100Upa-GM-MØ. Three independent donors are identified as I, II and III. **E** GSEA on the ranked comparison of the GM-MØ versus 10Upa-GM-MØ and GM-MØ versus 100Upa-GM-MØ transcriptomes, using the genes significantly modulated by GM-CSF (GM-MØ-specific markers) and M-CSF (M-MØ-specific markers) as data set. Normalized Enrichment Score (NES) and False Discovery Rate (FDR_q) are indicated. **F** Relative expression of the indicated genes as determined by RNA-sequencing on GM-MØ, 10Upa-GM-MØ and 100Upa-GM-MØ. Mean \pm SEM of 4 independent donors are shown, with the indication of the P_{adj} . **G** Production of activin A, IL-10 and LGMN by GM-MØ, 10Upa-GM-MØ and 100Upa-GM-MØ. Mean \pm SEM of 8 independent donors are shown ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test; $F = 92.63$ for Activin A, $F = 17.85$ for IL-10, $F = 33.39$ for LGMN). **H** Immunoblot analysis of CD163 and FOLR2 (down) by GM-MØ, 10Upa-GM-MØ, 100Upa-GM-MØ and monocytes differentiated with M-CSF (M-MØ). In panels A–G, vinculin or GAPDH protein levels were determined as protein loading controls and a representative experiment of two independent donors is shown. **I** Phagocytic activity in GM-MØ, 100Upa-GM-MØ and M-MØ. Mean \pm SEM of 5 independent donors are shown ($*p < 0.05$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test, $F = 13.74$). **J** Production of TNF α , IL-6 and IL-10 by GM-MØ and 100Upa-GM-MØ challenged with LPS for 24 h, as determined by ELISA. Mean \pm SEM of 7–8 independent donors are shown ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, paired t-test)

extent, this enrichment was also seen in 10Upa-GM-MØ (Fig. 4A), further emphasizing the dose-dependent action of Upa. Consequently, exposure to Upadacitinib impairs the acquisition of the transcriptional profile of pathogenic RAMØ and also prompts the expression of genes that define STM clusters primarily involved in homeostasis and resolution of inflammation. At the functional level, 100Upa-GM-MØ exhibited higher efferocytosis than GM-MØ (Fig. 4B–C, Supplementary Fig. 2F and video microscopy) an anti-inflammatory activity related to MERTK^{pos} STM subsets [3] and the protective role of the MerTK pathway in joint pathology [45]. In agreement with these findings, analysis of the MoMac-VERSE (a resource that identifies conserved monocyte and macrophage states and global imprinting across human tissues) [46] (GSE178209) revealed that the transcriptome of 100Upa-GM-MØ is significantly enriched in the gene cluster that defines the macrophage HES1_Mac cluster 2, that exhibits a “long-term resident”-like macrophage signature (GSE188647), as well as genes that characterize tissue-resident macrophages from

various tissues and organs, including *LG MN*, *MS4A6A* and *MAFB* [47] (Supplementary Fig. 3A–C).

The macrophage re-programming effect of Upadacitinib relies on the MAFB transcription factor

To identify the molecular basis of the macrophage re-programming effect of Upadacitinib we initially used Discriminant Regulon Expression Analysis (DoRothEA) [31]. The transcriptome of 100Upa-GM-MØ showed a negative enrichment in STAT1 and STAT2 regulons (Fig. 5A), as expected from the inhibitory effects of JAKi, and also exhibited diminished expression of the HIF1A-regulon, a result corroborated by the lower lactate release from 100Upa-GM-MØ cells, which also exhibited diminished levels of HIF1-regulated genes like *SLC2A1*, *EGLN3* and *AQP3* (Supplementary Fig. 4A–B) [48]. Importantly, Upadacitinib modified metabolic parameters in GM-MØ, including both glycolytic capacity and maximal ATP production (Supplementary Fig. 4C–G), indicating that JAKi alters not only the inflammatory but also the metabolic state in macrophages.

Conversely, DoRothEA revealed that the gene profile of 100Upa-GM-MØ is highly enriched in MAFB and MAF regulons (Fig. 5A), in agreement with the gene ontology data (Supplementary Fig. 3) and overexpresses the “M-MØ-specific” gene set [43] (Fig. 2E), whose M-CSF-driven acquisition is MAFB/MAF-dependent [10, 12, 49, 50]. Supporting the significance of these findings, the transcriptome of 100Upa-GM-MØ showed a high overrepresentation of MAFB- and MAF-dependent genes (Fig. 5B). As *MAFB* gene expression was also enhanced in 100Upa-GM-MØ (Fig. 5C), we next assessed MAFB protein level in macrophages generated in the presence of Upa. As shown in Fig. 5D, 100Upa-GM-MØ exhibited elevated MAFB protein levels as well as enhanced levels of inactive (Ser9-phosphorylated) GSK3 β , whose active form limits MAFB protein and activity [51]. The higher expression of MAFB was observed at all time points along 100Upa-GM-MØ differentiation (Fig. 5E) and matched with a progressive enhancement of the expression of the MAFB-dependent protein CD163 (Fig. 5E). Therefore, the macrophage re-programming activity of Upadacitinib coincides with a dose-dependent increase in the expression of MAFB and MAFB-targets [12]. In fact, short-term exposure to Upa (two doses in the last 48 h of differentiation of GM-MØ) (Fig. 5F) sufficed to increase the expression of MAFB, enhance the inhibitory phosphorylation of GSK3 β (Fig. 5G) and reduce activin A production (Fig. 5H), further reinforcing the link between the re-programming action of Upadacitinib and MAFB.

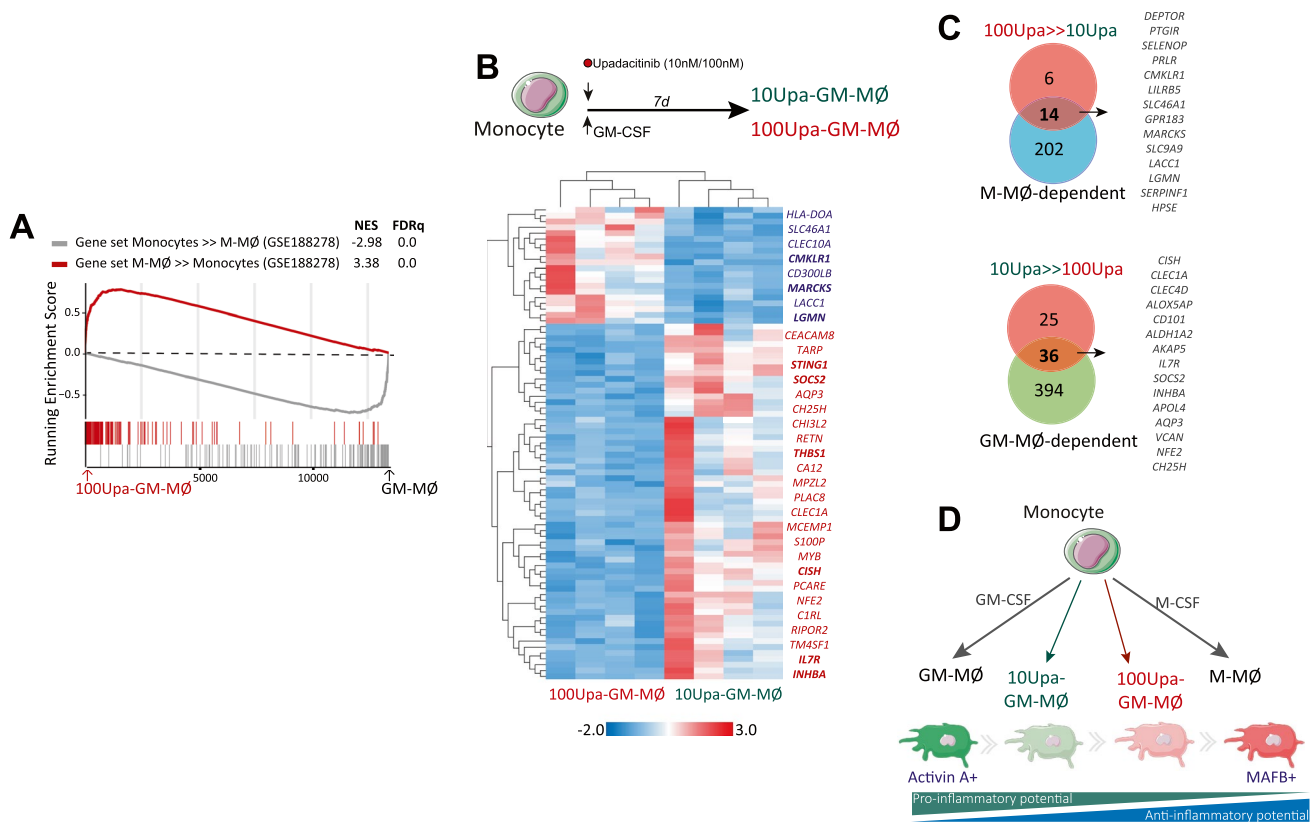


Fig. 3 Dose-dependent effect of Upadacitinib on monocyte differentiation **A** GSEA on the ranked comparison of the GM-MØ versus 100Upa-GM-MØ transcriptome, using the genes significantly modulated along the monocyte-to-M-MØ differentiation as data set. NES and FDRq value are indicated. **B** Heatmap of the expression of genes significantly ($\log_2\text{FC} > 1$; $p < 0.05$) altered by Upadacitinib in

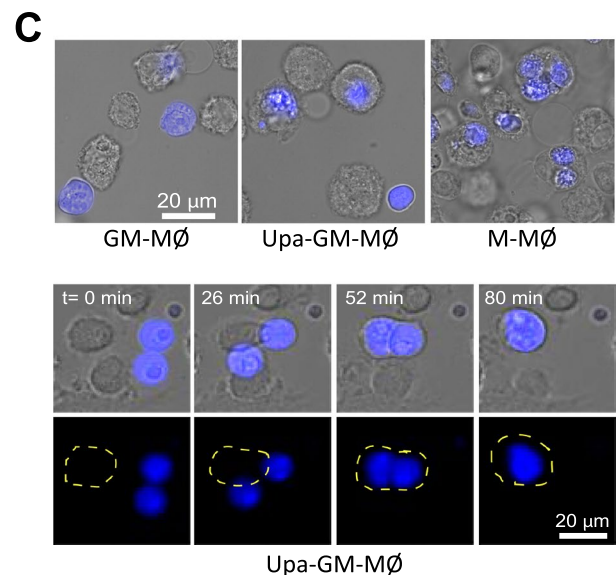
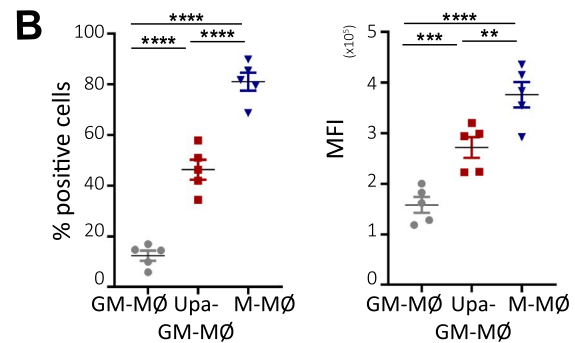
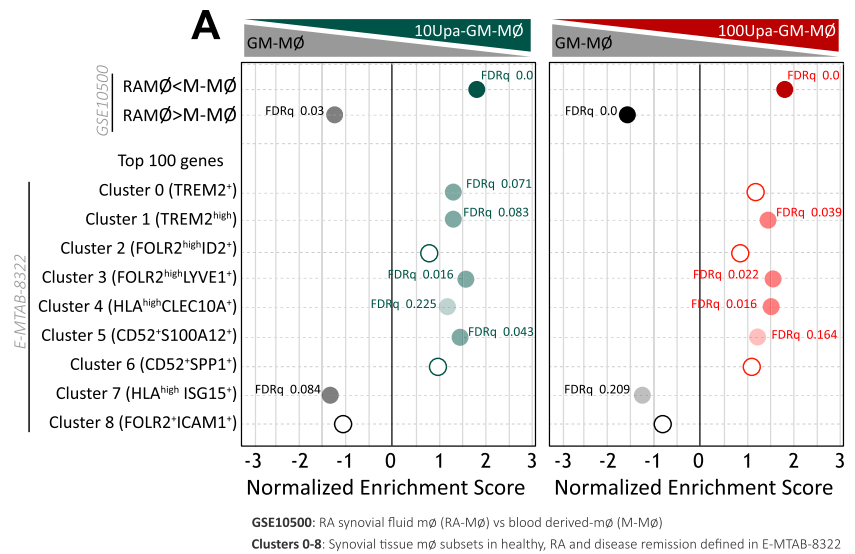
10Upa-GM-MØ and 100Upa-GM-MØ, as determined by RNAseq, data is represented as read counts standardized into z-score. **C** Comparison of genes differentially expressed in the indicated macrophage types. **D** Schematic representation of the dose-dependent effect of Upadacitinib on monocyte-to macrophage differentiation

As blocking JAK2 activation with Upadacitinib results in impaired GM-CSF-induced STAT5 and ERK phosphorylation (Fig. 2A), we next compared MAFB expression in GM-CSF-primed monocytes exposed to Upa or known inhibitors of STAT5 and ERK. Interestingly, Upa treatment results in a stronger MAFB expression than STAT5 or ERK-activating inhibitors (Fig. 5I), suggesting that, besides STAT5 and ERK, JAK2 might trigger additional intracellular signaling directly involved in controlling the anti-inflammatory differentiation of human macrophages. In this regard, and to determine whether MAFB mediates the macrophage re-programming action of Upadacitinib, we evaluated the effect of Upa after siRNA-mediated MAFB knock-down in monocytes. Importantly, knock-down of MAFB (Fig. 5J) significantly reduced the positive effect of Upa on the expression of *IL10*, *CMKLR*, *LGMN*, *CD163*, *FOLR2* and *MS4A6A* (Fig. 5K). Therefore, MAFB mediates the reprogramming action of Upadacitinib during the GM-CSF-dependent differentiation of human monocyte-derived macrophages.

Macrophage re-programming by other JAK inhibitors

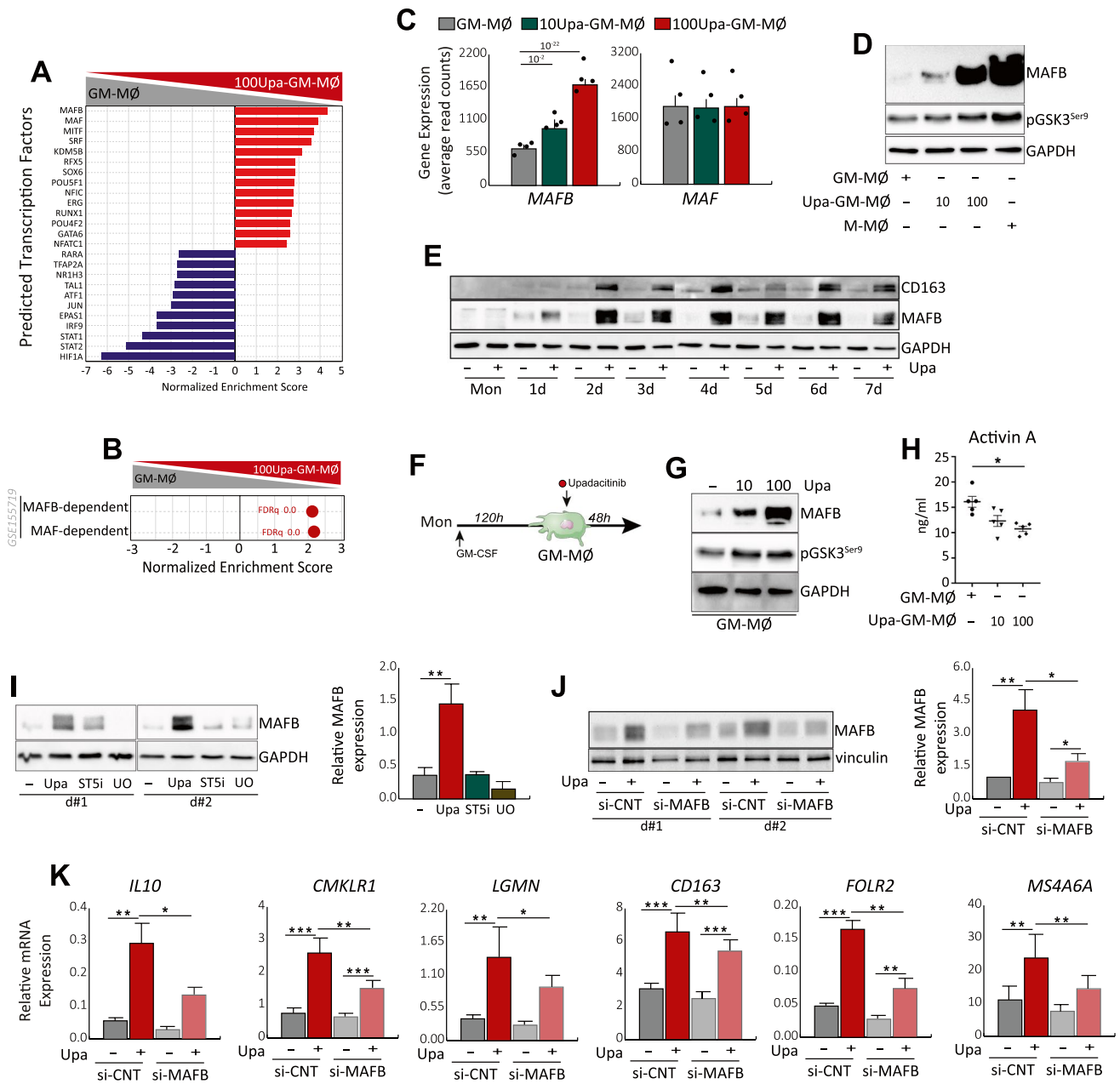
To date, five different JAKi (Tofacitinib, Baricitinib, Upadacitinib, Peficitinib and Filgotinib) have been approved for the treatment of RA [20, 24]. Given the re-programming action of Upadacitinib, we next asked whether other JAKi also exhibit a similar effect on the GM-CSF-dependent monocyte-derived macrophages. After checking for minimal effects on cell viability (Supplementary Fig. 2A), monocytes were exposed to different concentrations of Baricitinib (Bari, JAK1/2 inhibitor), Tofacitinib (Tofa, JAK1-3 inhibitor), Peficitinib (JAK3 inhibitor), Filgotinib (JAK1 inhibitor) and the TYK2 inhibitor Deucravacitinib each day along the monocyte-to macrophage differentiation process. Like Upa, long-term Bari treatment enhanced expression of the anti-inflammatory “M-MØ-specific” gene set, diminished expression of the pro-inflammatory “GM-MØ-specific” gene set, and augmented the expression of genes that define the tissue-resident homeostatic *TREM2*^{high} and

Fig. 4 Upadacitinib modulates the expression of genes that define macrophage subsets relevant in RA **A** GSEA on the ranked comparison of the GM-MØ versus 10Upa-GM-MØ and GM-MØ versus 100Upa-GM-MØ transcriptomes, using the genes preferentially expressed by control or RA-specific macrophages (GSE10500) and RA-specific clusters of synovial tissue macrophage (E-MTAB-8322) as data set. NES and FDRq value are indicated (FDRq < 0.01, dark filled circle; FDRq > 0.250, empty circle). The intensity of color increases with the enrichment of the gene signature. **B** Efferocytosis (% positive cells and mean fluorescence intensity) of GM-MØ, 100Upa-GM-MØ and M-MØ as determined by flow cytometry using staurosporine-induced CellTrace Violet-labeled apoptotic Jurkat cells. Mean ± SEM of 5 independent donors are shown (**p < 0.01; ***p < 0.001, ****p < 0.0001, one-way ANOVA with Tukey’s post hoc test, F = 137.2 for % positive cells, F = 70.32 for MFI). **C** Above, representative images of macrophages (GM-MØ, 100Upa-GM-MØ or M-MØ) and apoptotic Jurkat cells (blue) after 1 h of co-culture, as indicated. Below, time-lapse of 100Upa-GM-MØ co-cultured with apoptotic Jurkat cells (blue) imaged for 120 min at 2-min intervals. Bright field images correspond to indicated time-lapse frames of co-culture. The macrophage shape is encircled in yellow to show its position and dynamics during the process. Bars, 20 µm



FOLR2^{high}LYVE1^{pos} subsets, as well as tissue-infiltrating antigen presenting HLA^{high}/CLEC10A^{pos} subsets (Fig. 6A), from RA patients [3]. Altogether, these results confirmed that JAKi (Upa and Bari) favor the acquisition of homeostatic/resolution properties exhibited by macrophages in vivo. Besides, Bari-treated macrophages showed diminished

expression of activin A and increased expression of IL-10, LGMN, CD163 and FOLR2 (Fig. 6B–D). More importantly, Bari dose-dependently increased MAFB and GSK3β Ser9 phosphorylation, and reduced activin A production, both after long-term (Fig. 6D) or short-term (Fig. 6E–G) treatment in mature macrophages, hence indicating its net



anti-inflammatory effect. Of note, clinically-used doses of Tofacitinib, Peficitinib and Filgotinib also increased the expression of CD163 and MAFB, an effect not seen with Deucravacitinib (Fig. 6H and Supplementary Fig. 5), thus implying that JAKi are capable of variably skewing the inflammatory differentiation of macrophages independently of their fine specificity.

Discussion

JAK inhibitors (JAKi) are targeted synthetic DMARD approved for the treatment of RA and other immune-mediated diseases, and target JAK-dependent signaling pathways of cytokines involved in inflammatory processes and immune regulation [21]. In the present manuscript we have evaluated the influence of clinically used doses of the JAKi Upadacitinib and Baricitinib on the GM-CSF-driven monocyte-to-macrophage differentiation. Our results indicate that JAKi not only weaken the expression of genes and proteins that characterize GM-CSF-dependent pro-inflammatory macrophages (activin A,

Fig. 5 JAKi increases the expression of MAFB transcription factor in macrophages **A** Discriminant regulon expression analysis (DoRothEA) of 100Upa-GM-MØ compared with GM-MØ. Top 25 transcription factors are shown. **B** GSEA of genes downregulated by siRNA MAFB and by siRNA MAF on macrophages (GSE155719) on the ranked comparison of the transcriptomes of 100Upa-GM-MØ and GM-MØ transcriptomes. NES and FDRq value are indicated. **C** Relative expression of *MAFB* and *MAF* as determined by RNA-sequencing on GM-MØ, 10Upa-GM-MØ and 100Upa-GM-MØ. Mean \pm SEM of 4 independent donors are shown, with the indication of the P_{adj} . **D** Immunoblot analysis of MAFB and pGSK3S9 by GM-MØ, 10Upa-GM-MØ, 100Upa-GM-MØ and M-MØ. **E** Immunoblot analysis of MAFB and CD163 along the monocyte to macrophage differentiation in the presence of 100 nM Upadacitinib (Upa). In panels (D-E), GAPDH protein levels were determined as protein loading control and a representative experiment of two (**E**) and four (**D**) independent donors is shown. **F** Schematic representation of the experiments: short term-Upadacitinib treatment to mature macrophages (GM-MØ). Immunoblot analysis of MAFB and pGSK3S9 (**G**) and production of activin A (**H**) by GM-MØ exposed to 10–100 nM Upadacitinib for the last 48 h. GAPDH protein levels were determined as protein loading control. In (**G**) a representative experiment of three independent donors is shown. In (**H**) mean \pm SEM of 5 independent donors are shown ($*p < 0.05$, $F = 12.28$). **I** Immunoblot analysis of MAFB in two independent preparations of differentiating GM-MØ (day 2) generated from monocytes exposed to DMSO (–), Upadacitinib (Upa, 100 nM), STAT5 phosphorylation specific inhibitor (ST5i, 50 μ M) or MEK1/2 inhibitor (UO, 2.5 μ M). Right, quantification of MAFB expression. **J** Immunoblot analysis of MAFB in two independent preparations of differentiating GM-MØ (day 2) generated from monocytes transfected with either siCNT or MAFB-specific siRNA (siMAFB) and exposed to DMSO (–) or 100 nM Upadacitinib (+). Right, quantification of MAFB expression. In panels I–J, mean \pm SEM of the relative MAFB protein levels in the macrophage subtypes from four independent donors are shown ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$). **K** Relative mRNA expression of the indicated MAFB-dependent genes in siCNT GM-MØ, siMAFB GM-MØ, siCNT Upa-GM-MØ and siMAFB Upa-GM-MØ (day 2). Mean \pm SEM of four independent experiments are shown ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$, $F = 3.7$ for *IL10*, $F = 6.8$ for *CMKLR1*, $F = 4.4$ for *LGMN*, $F = 56.89$ for *CD163*, $F = 9.24$ for *FOLR2*, $F = 8.34$ for *MS4A6A*)

IL1B) but also promote macrophage re-programming via enhanced expression of MAFB and MAFB-dependent genes (CD163, IL-10, LGMN) and the acquisition of an anti-inflammatory transcriptional and functional profile in vitro. The rise in MAFB and MAFB-dependent genes in Upa-treated macrophages correlates with increased of Ser-9 inactivating phosphorylation of GSK3 β . However, the link between JAK2 inhibition and GSK3 β inactivation remains unclear. We speculate that JAK2 inhibition affects Ser-9 GSK3 β phosphorylation through PI3K-Akt or ERK, as these kinases are phosphorylated by JAK2 and target GSK3 β at Ser-9. Alternatively, Upadacitinib may boost MAFB protein levels via ERK, which primes GSK3 β -mediated phosphorylation and degradation of MAFB [52, 53]. In any event, since ERK inhibition alone does not raise MAFB levels (Fig. 5I), the higher MAFB levels in Upa-treated macrophages would be only partly mediated by the JAK2-ERK axis.

The pathological relevance of the re-programming effect of JAKi on human macrophages is supported by their effects on the expression of genes that define macrophage subsets specifically involved in tissue homeostasis and inflammation resolution. The analysis of synovial tissue macrophages from RA patients has previously identified inflammatory macrophage subsets (MerTK^{pos} and MerTK^{neg}) which exhibit distinct gene profiles and whose presence is modulated during remission [3, 6]. Whereas tissue-resident MerTK^{pos} macrophages include TREM2^{high} macrophages in the protecting lining and FOLR2^{high}LYVE1^{pos} macrophages in the sublining layer, the latter showing a unique remission transcriptomic signature, the tissue infiltrating MerTK^{neg} macrophage subset exhibits inflammatory functions [3]. Remarkably, we have found that Upadacitinib and Baricitinib favor the acquisition of genes that define the macrophage subsets TREM2^{pos} and FOLR2^{high}LYVE1^{pos}, primarily related to homeostasis and resolution of inflammation, thus supporting the therapeutic effect of JAKi on synovial macrophages [3]. Thus, as a whole, the JAK inhibitors Upadacitinib and Baricitinib limit the GM-CSF pro-inflammatory differentiation profile, block the inhibitory action of GM-CSF on anti-inflammatory pathways and drive a MAFB-dependent macrophage re-education.

In agreement with previous reports on cytokine-stimulated STAT phosphorylation [26], our analysis of JAKi-treated macrophages has revealed a dose-dependent effect of Upadacitinib on STAT5 phosphorylation, on modulation of STAT5-, GM-CSF- and M-CSF-dependent genes and proteins, on the macrophage re-direction towards an anti-inflammatory profile and on the expression of genes that characterize certain synovial macrophage subsets. On the other hand, it is worth noting that although all JAKi approved for RA treatment exhibit different specificity (Upadacitinib, a JAK1 inhibitor with effects on JAK2; Baricitinib, primarily a JAK1/2 inhibitor; Peficitinib, inhibitor of JAK3 over JAK1/2, and Filgotinib, primarily a JAK1 inhibitor), they all share a similar ability to re-direct macrophage differentiation and to dose-dependently induce MAFB and CD163 expression in GM-CSF-treated monocytes. The significance of this finding is further illustrated by lack of effect of Deucravacitinib, a TYK2 inhibitor, on the expression of MAFB and CD163 in pro-inflammatory monocytes.

Although JAKi are generally well tolerated and exhibit a comparable safety profile to other bDMARDs [20, 24], a small increase in the risk of herpes zoster infection and other viruses have been observed in JAKi-treated patients [54, 55]. The viral reactivation is likely based on the ability of JAKi to block interferon I and II pathways [56]. Consequently, the effect of JAKi on the expression of MAFB is of particular interest because MAFB is known to modulate the efficiency of interferon production by setting a threshold for

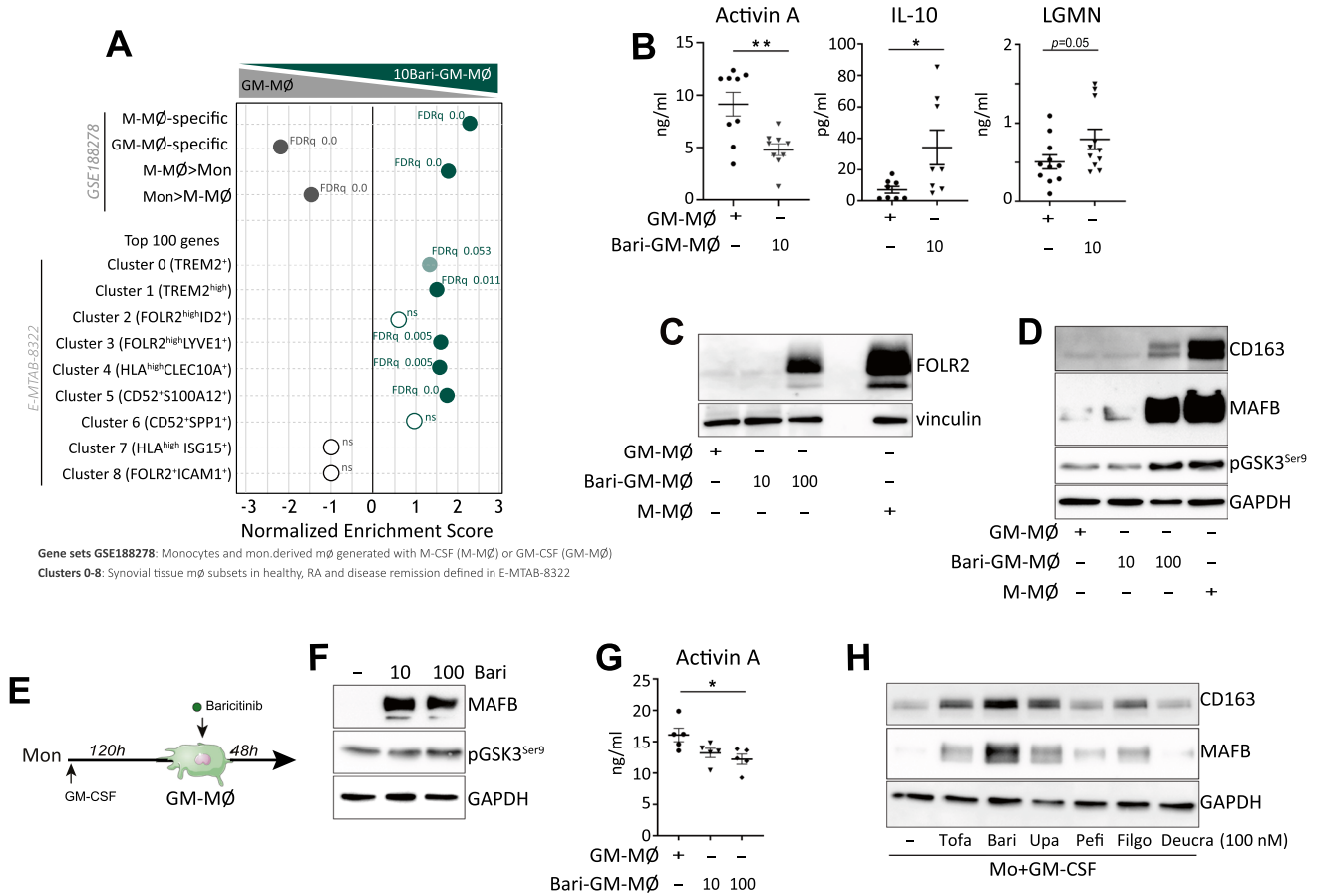


Fig. 6 Macrophage re-programming by other JAK inhibitors
A Monocytes were exposed to 10 nM Baricitinib daily during macrophage differentiation process with GM-CSF and the RNA levels were determined at day 7 on GM-MØ and 10Bari-GM-MØ. GSEA on the ranked comparison of the GM-MØ versus 10Bari-GM-MØ transcriptomes, using the genes preferentially expressed by GM-CSF (GM-MØ-specific) and M-CSF (M-MØ-specific) (GSE188278) and RA-specific clusters of synovial tissue macrophages (E-MTAB-8322) as data set. NES and FDRq value are indicated (FDRq < 0.01, dark filled circle; FDRq > 0.250, empty circle). **B** Production of activin A, IL-10 and LGMN by GM-MØ and 10Bari-GM-MØ. Mean ± SEM of 8–9 independent donors are shown (*p < 0.05, **p < 0.01, one-way ANOVA with Tukey’s post hoc test). **C–D** Immunoblot analysis of FOLR2 (**C**) MAFB, CD163 and pGSK3S9 (**D**) by GM-MØ, 10Bari-GM-MØ, 100Bari-GM-MØ

and monocytes differentiated with M-CSF (M-MØ). Vinculin and GAPDH protein levels were determined as protein loading control. A representative experiment of two (**C**) and four (**D**) independent donors is shown. **E** Schematic representation of the experiments: short-term Baricitinib treatment to GM-MØ. Immunoblot analysis of MAFB and pGSK3S9 (**F**) and production of activin A (**G**) by GM-MØ exposed to 10–100 nM Baricitinib for the last 48 h. GAPDH protein levels were determined as protein loading control. In (**F**) a representative experiment of three independent donors is shown. In (**G**) mean ± SEM of 5 independent donors are shown (*p < 0.05, F = 7.26). **H** Immunoblot analysis of MAFB and CD163 in GM-MØ (day 2) generated from monocytes exposed to DMSO (–) or 100 nM Tofacitinib (Tofa), Baricitinib (Bari), Upadacitinib (Upa), Peficitinib (Pefi), Filgotinib (Filgo) or Deucravacitinib (Deucra). A representative experiment of two independent donors is shown

IRF3-dependent transcription [57]. Thus, our data suggest that the JAKi-dependent expression of MAFB might not be limited to macrophage re-programming towards an anti-inflammatory/homeostatic profile (CD163⁺FOLR2⁺IL10⁺) but contribute to vulnerability to viral infections through interferon regulation, an issue that deserves further investigation.

Our findings on the JAKi ability to trigger MAFB-dependent macrophage re-programming is reminiscent of the capacity of other drugs used for RA treatment to modulate MAFB expression. As an example, we have

previously shown that high-dose methotrexate alters macrophage re-programming and downregulates the expression of MAFB [58]. Similarly, glucocorticoids, potent anti-inflammatory agents, skew monocyte differentiation in RA joints in a MAFB-dependent manner and via a transcriptional mechanism involving the binding of the glucocorticoid receptor (GR) to MAFB gene regulatory regions [59]. Specifically, GR binds both the promoter and enhancer regions within the MAFB gene, which is quickly upregulated and triggers the transcriptomic and epigenomic remodeling that gives

rise to tolerogenic monocyte-derived dendritic cells. Given the significance of this mechanism, it might be of interest to determine whether GR is involved in the JAKi-induced MAFB enhanced expression. In this regard, we have observed that JAK2 inhibition by Upadacitinib results in upregulation of MAFB protein expression, an effect not seen after inhibition of either STAT5 or MEK (Fig. 5I). This result suggests that JAKi might alter macrophage differentiation by affecting additional intracellular signaling molecules. Indeed, we have found a correlation between the inhibitory Ser9 phosphorylation of GSK3 β [60] and MAFB levels in JAKi-treated monocytes and macrophages (Figs. 5D, 6D). Since MAFB protein levels and activity is regulated by GSK3 β [51, 53], and considering that GSK3 β inhibition has an anti-inflammatory effect during chronic inflammation and ameliorates the clinical signs and tissue damage in the collagen-induced arthritis mouse model [61, 62], it is tempting to hypothesize that modulation of GSK3 β activity might contribute to the JAK2-dependent human macrophage re-programming ability of JAKi. In any event, and regardless their potential action of GSK3 β , our data reveal that JAKi re-direct macrophage differentiation towards the acquisition of a more anti-inflammatory/pro-resolution profile, an effect that correlates with the ability of JAKi to enhance MAFB expression.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00018-024-05196-1>.

Acknowledgements This work was supported by Grants PI20/00316, PI23/00224 and Red de Enfermedades Inflamatorias (REI, RICORS RD21/0002/0034), from Instituto de Salud Carlos III and cofinanced by the European Regional Development Fund “A way to achieve Europe” (ERDF) to APK, and Dirección General de Innovación e Investigación Tecnológica de la Comunidad de Madrid (RETAR-A-COVID P2022/BMD-7274) to APK. IR was funded by a Formación de Personal Investigador predoctoral fellowship from Ministerio de Ciencia e Innovación (Grant PRE2021-097080). ANV was funded by YEI Program from Comunidad de Madrid (PEJ-2021-AI/BMD-23327). The authors acknowledge Laura Díaz (Unidad de Citometría de Flujo, IISGM), Concha Nieto and José María Bellón (Unidad de Bioestadística, IISGM) for technical help and Dr Juan D. Cañete and Angel L. Corbí for helpful discussions.

Author contributions BLN, MSF, IR, MTS, AS, MTT, ANV, IC performed research and analyzed data; IC, APK conceived the study; APK designed the research, analyzed data and wrote the paper. All authors had final approval of the version.

Funding This work was supported by Grant PI20/00316, PI23/00224 and Red de Enfermedades Inflamatorias (REI, RICORS RD21/0002/0034), from Instituto de Salud Carlos III and cofinanced by the European Regional Development Fund “A way to achieve Europe” (ERDF) to APK, and Dirección General de Innovación e Investigación Tecnológica de la Comunidad de Madrid (RETAR-A-COVID P2022/BMD-7274) to APK. IR was funded by a Formación de Personal Investigador predoctoral fellowship from Ministerio de

Ciencia e Innovación (Grant PRE2021-097080). ANV was funded by YEI Program from Comunidad de Madrid (PEJ-2021-AI/BMD-23327).

Data availability The dataset supporting the conclusions of this article is available in the Gene Expression Omnibus repository (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GSE232044 and GSE253495.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no potential conflicts of interest.

Ethical approval This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethical Committee of Hospital General Universitario Gregorio Marañón (protocol code: JAKi-2022-v1 and ESCL_REUINM_2023). Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- McInnes IB, Schett G (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365:2205–2219. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1004965>
- Alivernini S, Firestein GS, McInnes IB (2022) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity* 55:2255–2270. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.11.009>
- Alivernini S, MacDonald L, Elmesmari A, Finlay S, Tolusso B, Gigante MR et al (2020) Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 26:1295–1306. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0939-8>
- Zhang F, Mears JR, Shakib L, Beynor JI, Shanaj S, Korsunsky I et al (2021) IFN-gamma and TNF-alpha drive a CXCL10+ CCL2+ macrophage phenotype expanded in severe COVID-19 lungs and inflammatory diseases with tissue inflammation. *Genome Med* 13:64. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00881-3>
- Zhang F, Wei K, Slowikowski K, Fonseka CY, Rao DA, Kelly S et al (2019) Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol* 20:928–942. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0378-1>
- Kurowska-Stolarska M, Alivernini S (2022) Synovial tissue macrophages in joint homeostasis, rheumatoid arthritis and disease remission. *Nat Rev Rheumatol* 18:384–397. <https://doi.org/10.1038/s41584-022-00790-8>
- Wicks IP, Roberts AW (2016) Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 12:37–48. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.161>

8. Hamilton JA (2020) GM-CSF in inflammation. *J Exp Med* 217:1. <https://doi.org/10.1084/jem.20190945>
9. Becher B, Tugues S, Greter M (2016) GM-CSF: from growth factor to central mediator of tissue inflammation. *Immunity* 45:963–973. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.026>
10. Hamilton JA (2013) Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8:533–544. <https://doi.org/10.1038/nri2356>
11. Ushach I, Zlotnik A (2016) Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol* 100:481–489. <https://doi.org/10.1189/jlbc.3RU0316-144R>
12. Cuevas VD, Anta L, Samaniego R, Orta-Zavalza E, Vladimir de la Rosa J, Baujat G et al (2017) MAFB determines human macrophage anti-inflammatory polarization: relevance for the pathogenic mechanisms operating in multicentric carpotarsal osteolysis. *J Immunol* 198:2070–2081. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601667>
13. Sierra-Filardi E, Puig-Kroger A, Blanco FJ, Nieto C, Bragado R, Palomero MI et al (2011) Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* 117:5092–5101. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-306993>
14. Puig-Kroger A, Sierra-Filardi E, Dominguez-Soto A, Samaniego R, Corcuera MT, Gomez-Aguado F et al (2009) Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer Res* 69:9395–9403. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2050>
15. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E et al (2004) Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4560–4565. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400983101>
16. Soler Palacios B, Estrada-Capetillo L, Izquierdo E, Criado G, Nieto C, Municio C et al (2015) Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin A-dependent pro-inflammatory profile. *J Pathol* 235:515–526. <https://doi.org/10.1002/path.4466>
17. Fuentelsaz-Romero S, Cuervo A, Estrada-Capetillo L, Celis R, Garcia-Campos R, Ramirez J et al (2020) GM-CSF expression and macrophage polarization in joints of undifferentiated arthritis patients evolving to rheumatoid arthritis or psoriatic arthritis. *Front Immunol* 11:613975. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.613975>
18. Burmester GR, McInnes IB, Kremer J, Miranda P, Korkosz M, Vencovsky J et al (2017) A randomised phase IIb study of mavrilimumab, a novel GM-CSF receptor alpha monoclonal antibody, in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 76:1020–1030. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210624>
19. Lee KMC, Achuthan AA, Hamilton JA (2020) GM-CSF: a promising target in inflammation and autoimmunity. *Immunotargets Ther* 9:225–240. <https://doi.org/10.2147/ITT.S262566>
20. Nash P, Kerschbaumer A, Dorner T, Dougados M, Fleischmann RM, Geissler K et al (2021) Points to consider for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases with Janus kinase inhibitors: a consensus statement. *Ann Rheum Dis* 80:71–87. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-218398>
21. Tanaka Y, Luo Y, O'Shea JJ, Nakayamada S (2022) Janus kinase-targeting therapies in rheumatology: a mechanisms-based approach. *Nat Rev Rheumatol* 18:133–145. <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00726-8>
22. Hu X, Li J, Fu M, Zhao X, Wang W (2021) The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduct Target Ther* 6:402. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1>
23. Saevarsdottir S, Stefansdottir L, Sulem P, Thorleifsson G, Ferkingstad E, Rutsdottir G et al (2022) Multiomics analysis of rheumatoid arthritis yields sequence variants that have large effects on risk of the seropositive subset. *Ann Rheum Dis* 81:1085–1095. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2021-221754>
24. Smolen JS, Landewe RBM, Bergstra SA, Kerschbaumer A, Sepriano A, Aletaha D et al (2023) EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2022 update. *Ann Rheum Dis* 82:3–18. <https://doi.org/10.1136/ard-2022-223356>
25. Avci AB, Feist E, Burmester GR (2021) The role of upadacitinib in the treatment of moderate-to-severe active rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 13:1759720X211047662. <https://doi.org/10.1177/1759720X211047662>
26. Nyirenda MH, Nijjar JS, Frleta-Gilchrist M, Gilchrist DS, Porter D, Siebert S et al (2023) JAK inhibitors disrupt T cell-induced proinflammatory macrophage activation. *RMD Open* 9:1. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2022-002671>
27. Fujita Y, Matsuoka N, Temmoku J, Furuya-Yashiro M, Asano T, Sato S et al (2020) JAK inhibitors impair GM-CSF-mediated signaling in innate immune cells. *BMC Immunol* 21:35. <https://doi.org/10.1186/s12865-020-00365-w>
28. Hoang TN, Pino M, Boddapati AK, Viox EG, Starke CE, Upadhyay AA et al (2021) Baricitinib treatment resolves lower-airway macrophage inflammation and neutrophil recruitment in SARS-CoV-2-infected rhesus macaques. *Cell* 184(460–475):e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.007>
29. Traves PG, Murray B, Campigotto F, Galien R, Meng A, Di Paolo JA (2021) JAK selectivity and the implications for clinical inhibition of pharmacodynamic cytokine signalling by filgotinib, upadacitinib, tofacitinib and baricitinib. *Ann Rheum Dis* 80:865–875. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-219012>
30. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA et al (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
31. Garcia-Alonso L, Holland CH, Ibrahim MM, Turei D, Saez-Rodriguez J (2019) Benchmark and integration of resources for the estimation of human transcription factor activities. *Genome Res* 29:1363–1375. <https://doi.org/10.1101/gr.240663.118>
32. Nagayoshi R, Nagai T, Matsushita K, Sato K, Sunahara N, Matsuda T et al (2005) Effectiveness of anti-folate receptor beta antibody conjugated with truncated *Pseudomonas* exotoxin in the targeting of rheumatoid arthritis synovial macrophages. *Arthritis Rheum* 52:2666–2675. <https://doi.org/10.1002/art.21228>
33. Smiljanovic B, Radzikowska A, Kuca-Warnawin E, Kurowska W, Grun JR, Stuhlmuller B et al (2018) Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint. *Ann Rheum Dis* 77:300–308. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211649>
34. Metcalf TU, Wilkinson PA, Cameron MJ, Ghneim K, Chiang C, Wertheimer AM et al (2017) Human monocyte subsets are transcriptionally and functionally altered in aging in response to pattern recognition receptor agonists. *J Immunol* 199:1405–1417. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700148>
35. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH et al (2011) Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118:e16-31. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326355>

36. Ancuta P, Liu KY, Misra V, Wacleche VS, Gosselin A, Zhou X et al (2009) Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC Genomics* 10:403. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-403>
37. Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, Yokouchi M, Ohtsubo M, Misawa H et al (1997) CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 89:3148–3154
38. Lehtonen A, Matikainen S, Miettinen M, Julkunen I (2002) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* 71:511–519
39. Estrada-Capetillo L, Aragonese-Fenoll L, Dominguez-Soto A, Fuentelsaz-Romero S, Nieto C, Simon-Fuentes M et al (2021) CD28 is expressed by macrophages with anti-inflammatory potential and limits their T-cell activating capacity. *Eur J Immunol* 51:824–834. <https://doi.org/10.1002/eji.202048806>
40. Zhang B, Zhang Y, Xiong L, Li Y, Zhang Y, Zhao J et al (2022) CD127 imprints functional heterogeneity to diversify monocyte responses in inflammatory diseases. *J Exp Med* 219:e20211191. <https://doi.org/10.1084/jem.20211191>
41. Schultze JL (2016) Reprogramming of macrophages—new opportunities for therapeutic targeting. *Curr Opin Pharmacol* 26:10–15. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.09.007>
42. Guthridge MA, Stomski FC, Thomas D, Woodcock JM, Bagley CJ, Berndt MC et al (1998) Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem cells* 16:301–313. <https://doi.org/10.1002/stem.160301>
43. Gonzalez de la Aleja A, Herrero C, Torres-Torresano M, de la Rosa JV, Alonso B, Capa-Sardon E et al (2022) Activation of LXR nuclear receptors impairs the anti-inflammatory gene and functional profile of M-CSF-dependent human monocyte-derived macrophages. *Front Immunol* 13:835478. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.835478>
44. Yarilina A, Park-Min KH, Antoniv T, Hu X, Ivashkiv LB (2008) TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat Immunol* 9:378–387. <https://doi.org/10.1038/ni1576>
45. Waterborg CEJ, Beermann S, Broeren MGA, Bennink MB, Koenders MI, van Lent P et al (2018) Protective role of the MER tyrosine kinase via efferocytosis in rheumatoid arthritis models. *Front Immunol* 9:742. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00742>
46. Mulder K, Patel AA, Kong WT, Piot C, Halitzki E, Dunsmore G et al (2021) Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity* 54(1883–1900):e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.007>
47. Dick SA, Wong A, Hamidzada H, Nejat S, Nechanitzky R, Vohra S et al (2022) Three tissue resident macrophage subsets coexist across organs with conserved origins and life cycles. *Sci Immunol* 7(67):eabf7777. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf7777>
48. Escribese MM, Sierra-Filardi E, Nieto C, Samaniego R, Sanchez-Torres C, Matsuyama T et al (2012) The prolyl hydroxylase PHD3 identifies proinflammatory macrophages and its expression is regulated by activin A. *J Immunol* 189:1946–1954. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201064>
49. Kim H (2017) The transcription factor MafB promotes anti-inflammatory M2 polarization and cholesterol efflux in macrophages. *Sci Rep* 7:7591. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07381-8>
50. Kang K, Park SH, Chen J, Qiao Y, Giannopoulou E, Berg K et al (2017) Interferon-gamma represses M2 gene expression in human macrophages by disassembling enhancers bound by the transcription factor MAF. *Immunity* 47(235–250):e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.07.017>
51. Eychene A, Rocques N, Pouponnot C (2008) A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer* 8:683–693. <https://doi.org/10.1038/nrc2460>
52. Benkhelifa S, Provot S, Nabais E, Eychene A, Calothy G, Felder-Schmittbuhl MP (2001) Phosphorylation of MafA is essential for its transcriptional and biological properties. *Mol Cell Biol* 21:4441–4452. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.14.4441-4452.2001>
53. Rocques N, Abou Zeid N, Sii-Felice K, Lecoin L, Felder-Schmittbuhl MP, Eychene A et al (2007) GSK-3-mediated phosphorylation enhances Maf-transforming activity. *Mol Cell* 28:584–597. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.009>
54. Cohen SB, Tanaka Y, Mariette X, Curtis JR, Lee EB, Nash P et al (2017) Long-term safety of tofacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis up to 8.5 years: integrated analysis of data from the global clinical trials. *Ann Rheum Dis* 76:1253–1262. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210457>
55. Yates M, Mootoo A, Adas M, Bechman K, Ramps S, Patel V et al (2021) Venous thromboembolism risk with JAK inhibitors: a meta-analysis. *Arthritis Rheumatol* 73:779–788. <https://doi.org/10.1002/art.41580>
56. Sunzini F, McInnes I, Siebert S (2020) JAK inhibitors and infections risk: focus on herpes zoster. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 12:1759720X20936059. <https://doi.org/10.1177/1759720X20936059>
57. Kim H, Seed B (2010) The transcription factor MafB antagonizes antiviral responses by blocking recruitment of coactivators to the transcription factor IRF3. *Nat Immunol* 11:743–750. <https://doi.org/10.1038/ni.1897>
58. Rios I, Lopez-Navarro B, Torres-Torresano M, Soler Palacios B, Simon-Fuentes M, Dominguez-Soto A et al (2022) GSK3beta inhibition prevents macrophage reprogramming by high-dose methotrexate. *J Innate Immun* 15:1–14. <https://doi.org/10.1159/000526622>
59. Morante-Palacios O, Ciudad L, Micheroli R, de la Calle-Fabregat C, Li T, Barbisan G et al (2022) Coordinated glucocorticoid receptor and MAFB action induces tolerogenesis and epigenome remodeling in dendritic cells. *Nucleic Acids Res* 50:108–126. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1182>
60. Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E (2007) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res* 32:577–595. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9128-5>
61. Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Muia C, Crisafulli C, Dugo L et al (2006) Glycogen synthase kinase-3beta inhibition attenuates the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse. *Clin Immunol* 120:57–67. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.03.005>
62. Kwon YJ, Yoon CH, Lee SW, Park YB, Lee SK, Park MC (2014) Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta suppresses inflammatory responses in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and collagen-induced arthritis. *Joint Bone Spine* 81:240–246. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2013.09.006>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

SUPPLEMENTARY FILE

MATERIALS AND METHODS

Clinical and demographic data of patients included in the study

Patient 1: A 50-year-old Caucasian woman with a 10-year history of seropositive rheumatoid arthritis (ACPA >3200 and rheumatoid factor positive at a titer of 1:80). She started conventional DMARDs including sulfasalazine hydroxychloroquine, methotrexate, and leflunomide and TNFi in June 2021 for persistent disease activity and radiographic progression. She experienced acceptable disease activity control with TNFi, but needed to suspend the biologic therapy in October 2021 for feet surgery. When TNFi was reinitiated, she experienced secondary failure and started upacitinib (rinvoq 15mg daily) in September 2022. General examination at that time revealed a pain on a visual analogue (VAS) of 7, patient global assessment VAS of 6, 3 tender joints, and 2 swollen joints. Laboratory investigations revealed a CRP of 18.4mg/L and ESR of 29 mm/h with a DAS28-CRP of 4.23 (moderate disease activity). She experienced a rapid control of inflammation being in remission by DAS-CRP in the last visit in May 2023.

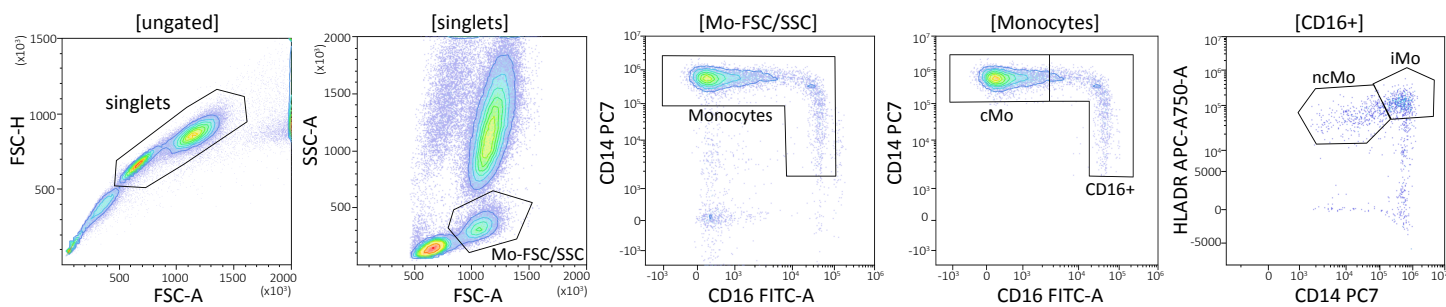
Patient 2: A 59-year-old Caucasian woman with a 3-year history of seropositive rheumatoid arthritis (ACPA >3200 and rheumatoid factor positive at a titer of 1:756) and Cushing disease secondary to pituitary adenoma treated with neurosurgery and radiation therapy. She started methotrexate (MTX) in July 2020 and the dose was increased up to 15mg weekly with control of disease activity. In February of 2022 MTX was suspended for splenic and hepatic lesions in CT scan suspicious for lymphoproliferative disease. She started treatment with prednisone and hydroxychloroquine with poor control of disease activity. After ruling out cancer with an extensive study, she started upacitinib (rinvoq 15mg daily) in February 2023. General examination at that time revealed a pain on a visual analogue (VAS) of 5, a patient global assessment on a VAS of 7, 5 tender joints, and 4 swollen joints. Laboratory investigations revealed a CRP of 25.3mg/L and ESR of 22 mm/h with a DAS28-CRP of 4.93 (moderate disease activity). She experienced good and rapid response being in remission at the 3 months follow up.

Patient 3: A 28-year-old Hispanic woman with a 2-year history of seropositive rheumatoid arthritis (ACPA 359.9 and rheumatoid factor positive at a titer of 1:49). She started (MTX) in April 2021 with rapid escalation of dose. She experienced important side effects when using 20 mg/weekly, mainly nausea, abdominal pain and hair loss, therefore MTX was reduced to 15mg weekly. In September 2022, she was admitted for a surgery procedure and MTX was suspended. After recovery, she did not reinitiated MTX and suffered a flare and prednisone was prescribed and MTX reinitiated. Adherence was poor because of side effects and the patient did not want to switch from oral to subcutaneous expressing needle phobia. In May 2023 she experienced a flare with morning stiffness of 1 hour, and 3 tender and 3 swollen joints (dominant hand) with a patient global assessment of 5, CRP and ESR were in normal range, and the patient suffered considerable limitation to perform

her work duties. She then was started on upacitinib (rinvoq 15mg daily) with complete resolution of symptoms in the 3 months follow-up.

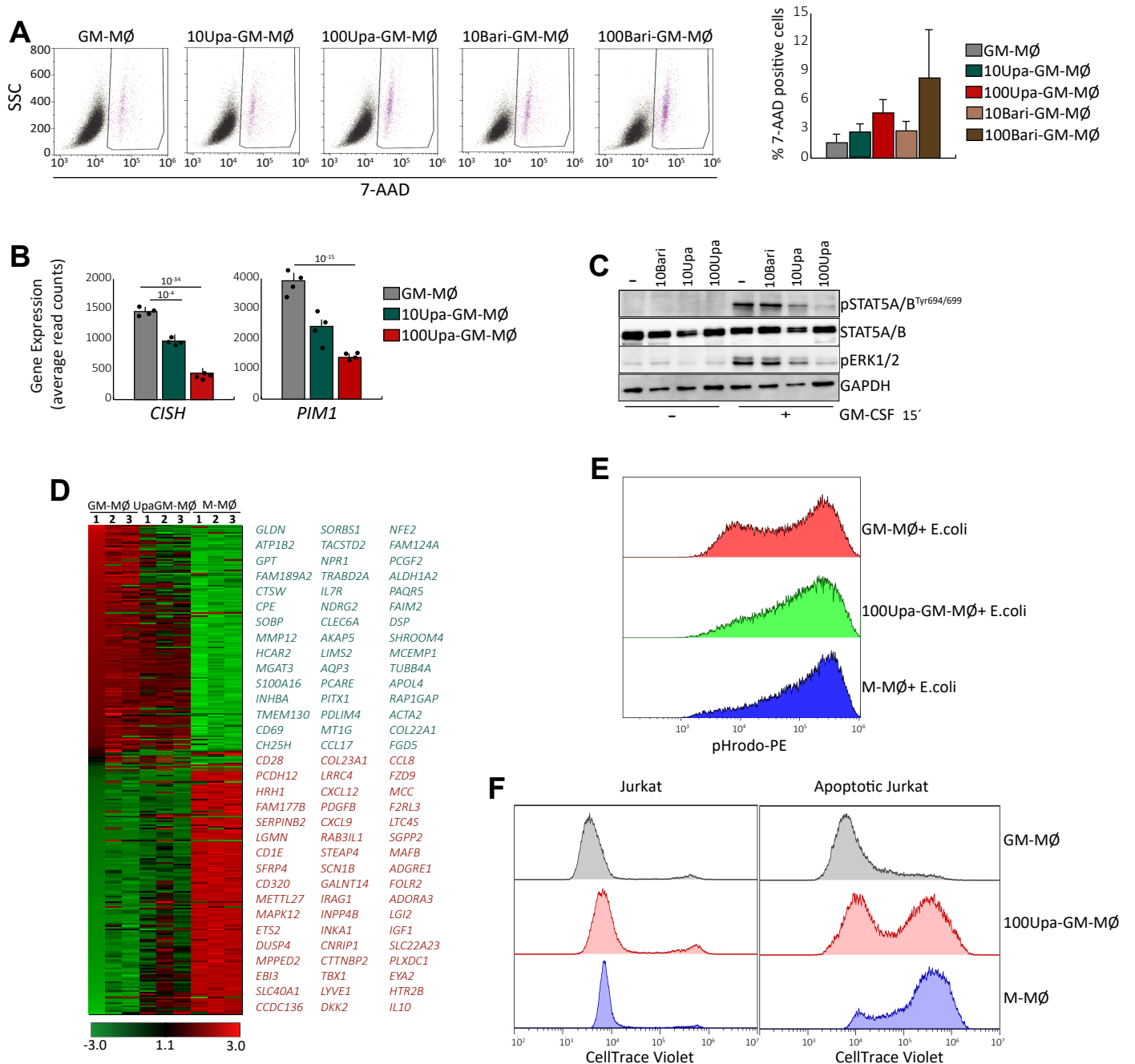
Nine sex-matched normal donors were selected after exclusion of autoimmune disease, neoplasia or active infection.

Supplementary Figure 1



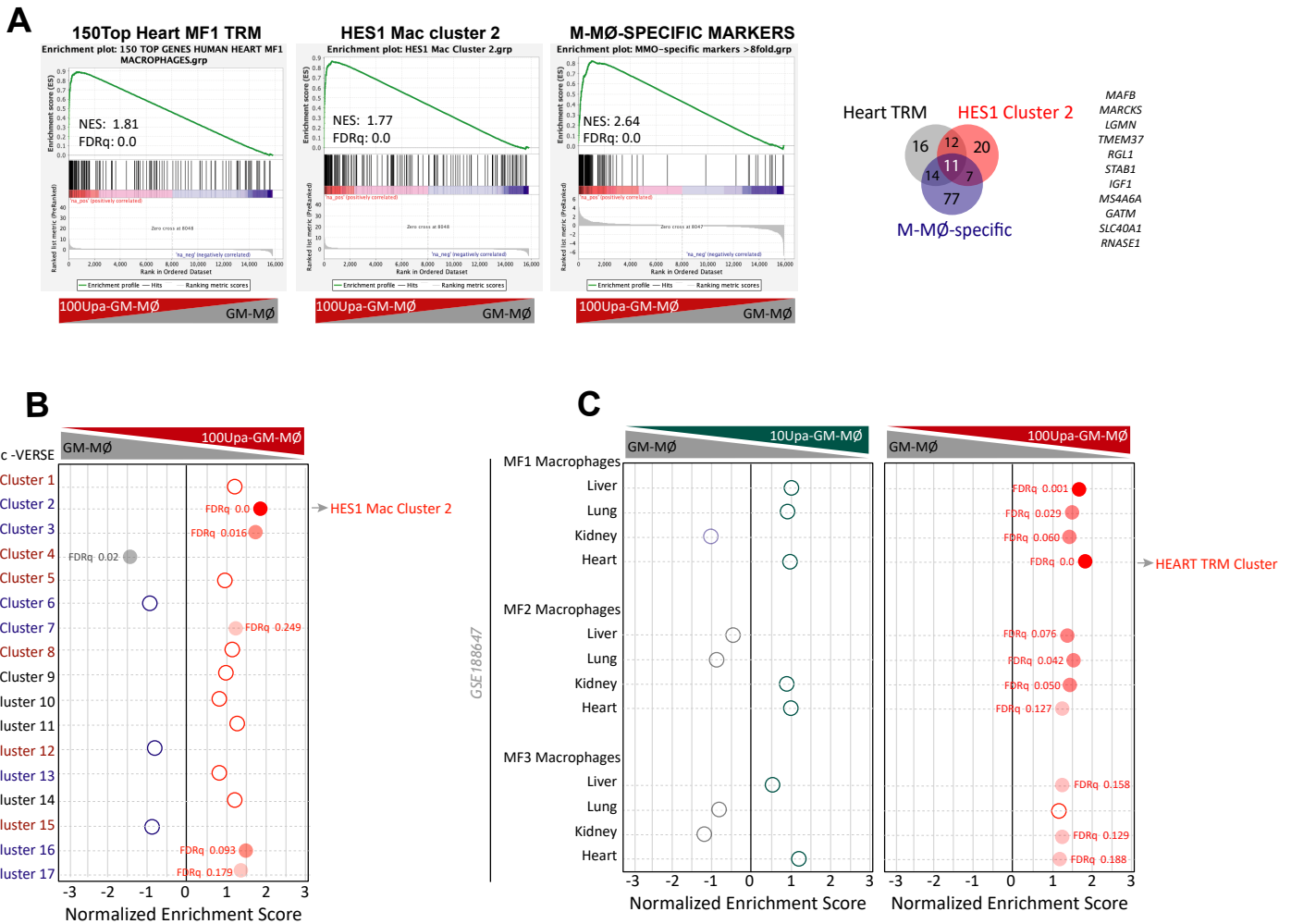
Supplementary Figure 1.- Gating strategy of the three monocyte subsets based on relative CD14, CD16 and HLADR expression. Monocytes were gated on the basis of singlets, forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) and CD14/CD16 expression. Monocyte subsets were identified as follows: Classical monocytes (cMo) were gated as CD14⁺⁺ CD16⁻ in the CD14/CD16 plot; the resulting CD16⁺ monocytes were analyzed by HLADR/CD14 expression, resulting in intermediate monocytes (iMo, CD14⁺⁺HLADR⁺⁺) and non-classical monocytes (ncMo, CD14⁺⁺HLADR⁺).

Supplementary Figure 2



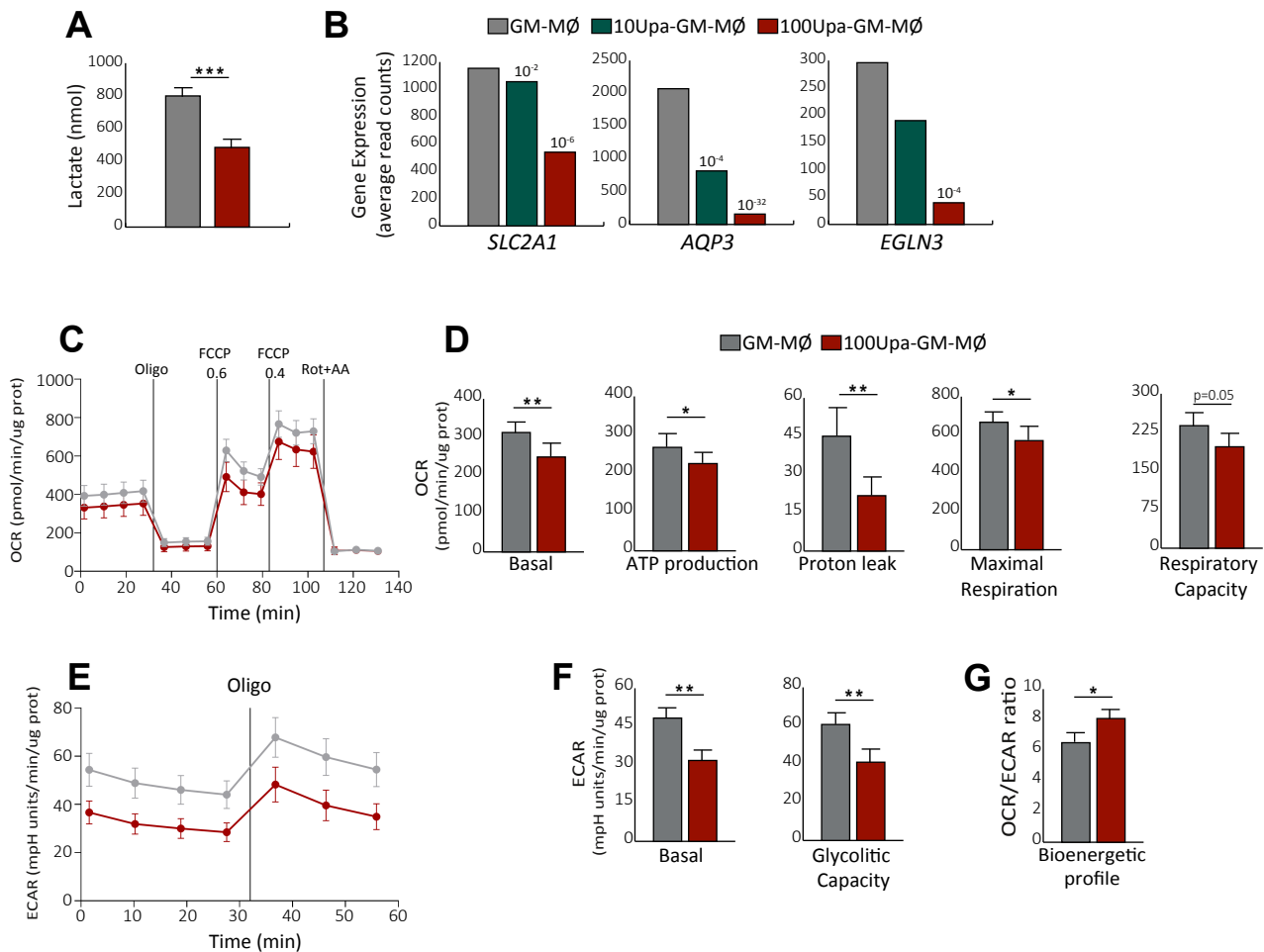
Supplementary Figure 2.- Effect of JAK inhibitors on macrophage viability, STAT5-dependent genes, STAT5 phosphorylation levels, phagocytosis and efferocytosis (A) Cellular viability, as determined by flow-cytometry using 7-aminoactinomycin D (7-AAD) in GM-MØ, 10Upa-GM-MØ, 100Upa-GM-MØ, 10Bari-GM-MØ and 100Bari-GM-MØ. A representative experiment is shown. Right, quantification of 7-AAD-positive cells in the indicated JAKi-exposed GM-MØ, as determined by flow-cytometry. Mean \pm SEM of three independent experiments are shown. **(B)** Relative expression of the indicated STAT5-dependent genes as determined by RNA-sequencing on GM-MØ, 10Upa-GM-MØ and 100Upa-GM-MØ. Mean \pm SEM of 4 independent donors are shown, with the indication of the *P*adj. **(C)** Immunoblot analysis of pSTAT5, STAT5, pERK and ERK by monocytes treated for 1h to DMSO (-), 10 nM Baricitinib (10Bari), 10 nM Upadacitinib (10Upa) or 100 nM Upadacitinib (100Upa) and exposed to GM-CSF for 15 min. GAPDH protein levels were determined as protein loading controls. A representative experiment of two independent donors is shown. **(D)** Heatmap of the expression of M-MØ-specific and GM-MØ-specific genes in GM-MØ, 100Upa-GM-MØ (from GSE232044) and M-MØ (data extracted from GSE186151). For each gene, mRNA expression level is represented after normalizing gene expression and k-means clustering using Genesis (<http://genome.tugraz.at/genesisclient/>). **(E)** Phagocytic activity of GM-MØ, 100Upa-GM-MØ and M-MØ as determined by flow cytometry using pHrodo Red E. coli BioParticles Conjugates. A representative histogram for pHrodo emission of GM-MØ, 100Upa-GM-MØ and M-MØ is shown. **(F)** Efferocytosis of GM-MØ, 100Upa-GM-MØ and M-MØ as determined by flow cytometry using CellTrace Violet-labeled Jurkat cells (left) or staurosporine-induced CellTrace Violet-labeled apoptotic Jurkat cells (right). A representative histogram for CellTrace Violet emission of GM-MØ, 100Upa-GM-MØ and M-MØ is shown.

Supplementary Figure 3



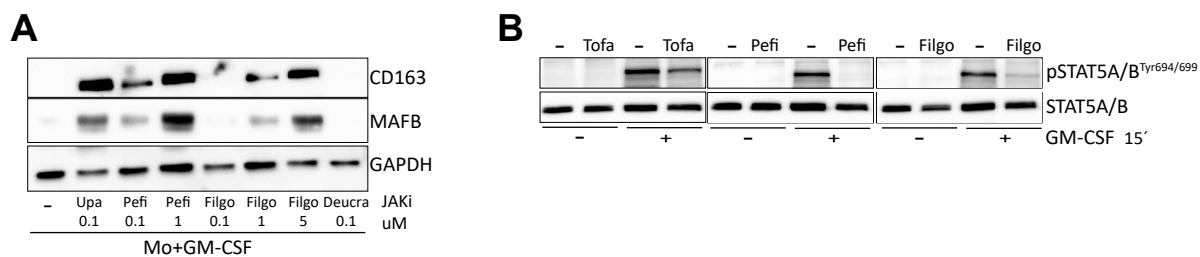
Supplementary Figure 3.- Upadacitinib modulates the expression of genes that define tissue-resident macrophage (A) GSEA on the ranked comparison of the GM-MØ versus 100Upa-GM-MØ transcriptomes, using the genes preferentially expressed by Heart macrophage cluster 1 (MF1) Tissue Resident Macrophages (TRM) (GSE188647), the genes preferentially expressed by HES1 Mac specific cluster 2 of tissue resident macrophages from the MoMac-VERSE (GSE178209), and the genes significantly modulated by M-CSF (M-MØ-specific markers) (GSE188278) as data set. Normalized Enrichment Score (NES) and False Discovery rate q value (FDRq) are indicated. Right, comparison of genes differentially expressed in the indicated macrophage types. **(B)** GSEA on the ranked comparison of the GM-MØ versus 100Upa-GM-MØ transcriptomes, using the monocyte and macrophage cluster defined in the MoMac-VERSE as data set. Normalized Enrichment Score and False Discovery rate q value (FDRq) are indicated. The intensity of color increases with the enrichment of the gene signature. **(C)** GSEA on the ranked comparison of the GM-MØ versus 10Upa-GM-MØ and GM-MØ versus 100Upa-GM-MØ transcriptomes, using the MF1, MF2 and MF3 clusters of tissue resident macrophages from liver, lung, kidney and heart (GSE188647) as data set. Normalized Enrichment Score and False Discovery rate q value (FDRq) are indicated. The intensity of color increases with the enrichment of the gene signature.

Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4.- Lactate, HIF1A-dependent gene expression and characterization of the energy metabolism in Upadacitinib-treated macrophages (A) Production of lactate by GM-MØ and 100Upa-GM-MØ. Mean \pm SEM of 16 independent donors ($***p < 0.001$, paired t-test). (B) Relative level of expression of the indicated genes as determined by RNA-sequencing on GM-MØ, 10Upa-GM-MØ and 100Upa-GM-MØ. (C) OCR profile of human GM-MØ and 100Upa-GM-MØ monitored using the Seahorse Biosciences extracellular flux analyzer. Cells were treated sequentially, as indicated, with 1 μ M oligomycin (Oligo), 0.6 plus 0.4 μ M FCCP, and 1 μ M rotenone plus 1 μ M antimycin A (Rot/AA). (D) Metabolic parameters obtained from the OCR profiling after subtraction of the rotenone/antimycin-insensitive respiration. Basal OCR is the oxygen consumption rate in the absence of effectors, ATP turnover is considered as the oligomycin-sensitive respiration, and maximal respiration is the OCR value in the presence of the uncoupler FCCP. Results are normalized according to protein concentrations and presented as mean \pm SEM of 6 independent samples. (E) ECAR, a proxy for the rate of lactate production, measured in human GM-MØ and 100Upa-GM-MØ under basal conditions and after the stimulation with 1 μ M oligomycin. (F) Metabolic parameters obtained from ECAR profiling. Basal indicates the rate of glycolysis in the absence of effectors, and glycolytic capacity is the ECAR value after the inhibition with oligomycin of the mitochondrial ATP synthesis. Results are normalized according to protein concentrations and presented as mean \pm SEM of 6 independent samples. (G) The bioenergetics profile of the cells is defined as the ratio between the basal OCR and basal ECAR. Results are presented as mean \pm SEM of 6 independent samples ($*p < 0.05$ $**p < 0.01$, paired t-test).

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5.- Effect of JAK inhibitors Peficitinib, Filgotinib and Deucravacitinib on MAFB, CD163 expression and STAT5 phosphorylation levels (A) Immunoblot analysis of MAFB and CD163 in GM-MØ (day 2) generated from monocytes exposed to DMSO (-) or the indicated concentrations of Upadacitinib (Upa), Peficitinib (Pefi), Filgotinib (Filgo) or Deucravacitinib (Deucra). A representative experiment of two independent donors is shown. **(B)** Immunoblot analysis of pSTAT5 and STAT5 by monocytes treated for 1h to DMSO (-), 100 nM Tofacitinib (Tofa), 1 uM Peficitinib (Pefi) or 5 uM Filgotinib (Filgo) and exposed to GM-CSF for 15 min. The concentrations were selected based on *in vivo* dosage. A representative experiment of two independent donors is shown.

DISCUSIÓN

El estudio de la población celular mieloide, concretamente la población de macrófagos, ha mostrado el importante papel del sistema inmunitario innato en el establecimiento y desarrollo de diferentes enfermedades. Los macrófagos poseen un amplio espectro de estados de polarización que les permite responder adecuadamente a lo que sucede a su alrededor, ya sea promover un proceso proinflamatorio para combatir una infección, o un proceso antiinflamatorio para resolver dicha inflamación y recuperar la homeostasis tisular. Esta plasticidad tan característica ha dado lugar a que surjan estrategias terapéuticas dirigidas hacia los macrófagos para que sirvan como herramientas para la resolución del proceso inflamatorio implicado en diferentes patologías, como el cáncer o la artritis reumatoide (RA) ¹¹³. En concreto, la reprogramación de macrófagos mediante fármacos ha permitido el cambio de dirección del proceso inflamatorio reduciendo o estimulando la producción de mediadores inflamatorios ^{31,274-276}, pero aún se desconocen los mecanismos a través de los que el metotrexato (MTX) o los inhibidores de JAK (JAKi) son capaces de ejercer este efecto reprogramador.

En los resultados obtenidos en esta tesis (resumidos en la **Fig. 11**) se ha observado que el empleo del inhibidor de JAK (JAKi) upadacitinib en monocitos estimulados con GM-CSF *in vitro* (Upa-GM-MØ), reprograma a los macrófagos proinflamatorios (GM-MØ) hacia un perfil funcional y transcripcional antiinflamatorio dependiente de la dosis de JAKi y del factor de transcripción MAFB. Específicamente, se observó un aumento en la expresión de *IL10*, *CD163*, *LGMN*, *FOLR2* y *MAFB*, genes típicos del perfil de expresión de macrófagos antiinflamatorios (M-MØ), que además fue validado en cuanto a la expresión proteica. Desde el punto de vista funcional, se observó que upadacitinib aumentaba la capacidad fagocítica y eferocítica de los GM-MØ, y respondían a estímulos patogénicos (como el LPS) produciendo menos IL-6 y más IL-10, semejante a las funciones de los M-MØ. El silenciamiento génico de MAFB demostró que este factor de transcripción es indispensable para que los GM-MØ adquieran la expresión de los genes *IL10*, *CD163*, *LGMN*, *FOLR2*, *CMKLR1* y *MS4A6A* por los JAKi. La comparación del perfil transcriptómico de los Upa-GM-MØ con respecto al perfil de macrófagos sinoviales descritos en la bibliografía por diferentes autores, determinó que estos macrófagos son similares a los macrófagos homeostáticos de la membrana sinovial o de otros tejidos, como el cardiaco. Adicionalmente, resultados preliminares del estudio observacional JAKi_MONOMAC en pacientes con RA activa que no responden adecuadamente a fármacos convencionales o bDMARDs y empiezan el tratamiento con JAKi, han mostrado que upadacitinib restaura el equilibrio de las subpoblaciones de monocitos de sangre periférica en pacientes con RA a las proporciones encontradas en la población sana. En contraste, el metotrexato empleado a dosis altas (HD-MTX) en monocitos estimulados con M-CSF *in vitro* (MTX-M-MØ), favorece su diferenciación hacia un perfil proinflamatorio alterando la expresión de los genes asociados a macrófagos antiinflamatorios *MAF*, *MAFB* y *CSFR1*, así como la producción de citoquinas en respuesta a LPS, aumentando la concentración de las citoquinas proinflamatorias IFNβ1 e IL-6. Interesantemente, el transcriptoma de los MTX-M-MØ se asemejaba al de los macrófagos asociados a tumor (TAMs) “pequeños” de perfil antitumoral ¹²¹, asociados con buen pronóstico al mejorar la tasa libre de supervivencia a cinco años en los pacientes con metástasis de hígado de cáncer colorrectal. Además, la inhibición de GSK3, una quinasa reguladora de la actividad de MAFB, mediante su inhibidor específico CHIR99021 impide la reprogramación proinflamatoria inducida por MTX en macrófagos M-MØ *in vitro*.

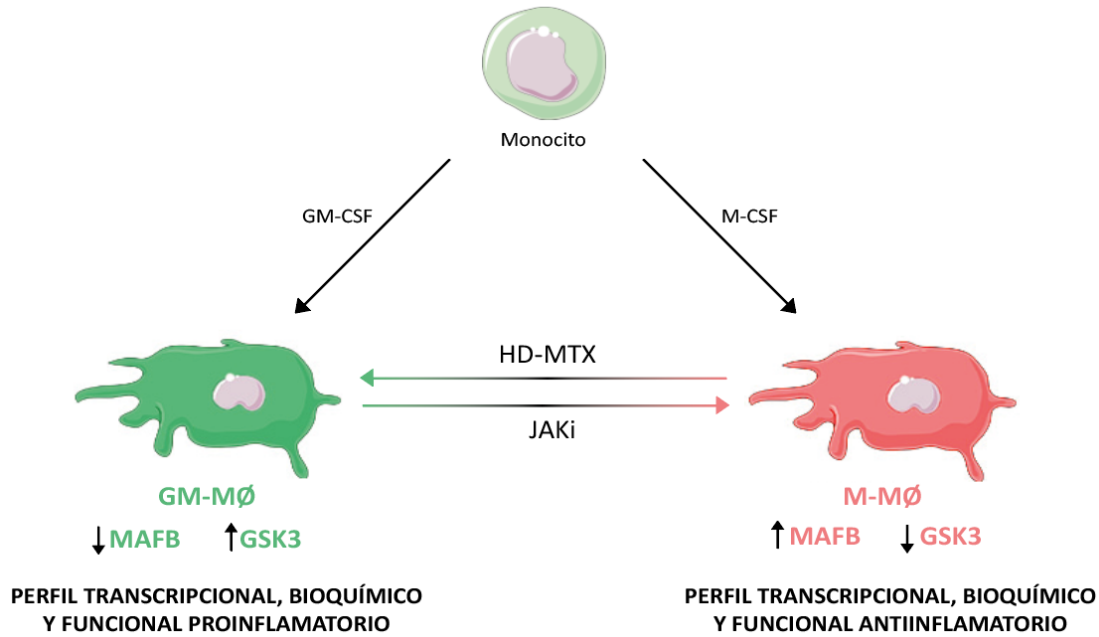


Figura 11. Esquema de los resultados obtenido en la tesis. Los fármacos HD-MTX y JAKi reprograman el perfil transcripcional, bioquímico y funcional de los macrófagos derivados de monocitos. HD-MTX reprograma a los macrófagos M-MØ hacia un perfil proinflamatorio similar al de los macrófagos GM-MØ. Por su parte, los JAKi reprograman a los macrófagos GM-MØ hacia un perfil antiinflamatorio similar al de los M-MØ. Las proteínas MAFB y GSK3 están implicadas en este proceso reprogramador y su regulación es clave en la adquisición de los marcadores específicos asociados a cada perfil inflamatorio.

Dado que en esta tesis se ha investigado el efecto reprogramador de los JAKi y de HD-MTX en macrófagos, procederé a discutir cómo estos fármacos influyen en la biología del macrófago.

Efecto de los fármacos JAKi y HD-MTX sobre la reprogramación transcripcional de macrófagos

El desarrollo de los estudios basados en ómicas ha permitido ampliar el conocimiento de las poblaciones y subpoblaciones celulares que conviven en los diferentes tejidos del organismo en homeostasis y patología. En este trabajo, se han generado *in vitro* macrófagos derivados de monocitos estimulados con GM-CSF o M-CSF y/o tratados con los fármacos JAKi o HD-MTX. El perfil transcripcional de estos macrófagos se ha comparado tanto con marcadores génicos específicos de macrófagos GM-MØ y M-MØ *in vitro* como con diferentes conjuntos de genes que describen a las subpoblaciones de macrófagos presentes en los tejidos humanos *ex vivo* para contextualizar *in vivo* los cambios producidos por el tratamiento con JAKi o HD-MTX.

a) JAKi

Los análisis mediante secuenciación del mRNA de macrófagos GM-MØ tratados con upadacitinib o baricitinib muestran que el transcriptoma de macrófagos tratados con JAKi se enriquece positivamente en conjuntos de genes que definen a la población de macrófagos antiinflamatorios generados *in vitro* en presencia de M-CSF, y negativamente en aquellos genes que definen a la población de macrófagos proinflamatorios generados *in vitro* en presencia de GM-CSF ²⁷⁷. Dada la falta de accesibilidad a muestras de tejido sinovial de pacientes con RA antes y después del tratamiento con JAKi con las que poder comparar el perfil transcriptómico, decidimos hacer la comparación con datos de scRNA-seq publicados por diferentes autores ^{165,278,279} (resumido en la **Fig. 12**). Como se mencionó en la introducción de la tesis, *Alivernini et al.* definieron nueve grupos fenotípicos de macrófagos sinoviales y al compararlos con el perfil transcriptómico de los Upa-GM-MØ/Bari-GM-MØ observamos que el tratamiento con JAKi favorece significativamente la adquisición de genes característicos de los grupos TREM2^{high} (1) y FOLR2^{high}LYVE1^{pos} (5), principalmente asociados a la homeostasis y resolución de la inflamación ¹⁶⁵. Este resultado sugiere que los macrófagos expuestos al tratamiento con JAKi *in vivo* podrían tener aumentada la expresión de genes implicados en la adquisición de los marcadores típicos de los macrófagos homeostáticos residentes en el tejido sinovial. Por otro lado, la similitud entre el perfil transcriptómico de los GM-MØ generados *in vitro* y los macrófagos patológicos encontrados en los pacientes con RA ha sido demostrada previamente por nuestro grupo ⁴⁰, por lo que los cambios observados en los experimentos con los GM-MØ tratados con upadacitinib pueden extrapolarse al contexto *in vivo*.

También se comparó el perfil transcriptómico de los Upa-GM-MØ con las subpoblaciones de macrófagos descritas por *Mulder et al.* denominada MoMAC-verse ²⁷⁸, así como con las subpoblaciones de macrófagos residentes que coexisten en diferentes tejidos, identificadas por *Dick et al.* ²⁷⁹. *Mulder et al.* integraron datos de scRNA-seq de fagocitos mononucleares (MNPs) de trece tejidos diferentes, de los que se extrajeron los marcadores de expresión que definen a los monocitos y macrófagos en el organismo, y crearon el MoMAC-verse. Este compendio identifica y caracteriza diecisiete grupos fenotípicos distintos, cada uno con sus propias firmas génicas y roles funcionales específicos: 1. Monocitos CD16+ (grupos #1 y #5); 2. Monocitos CD16- (grupos #8 y #15); 3. Monocitos ISG (grupos #4, #8, #12) que expresan genes estimulados por interferón (ISG), como ISG15, ISG20, IFIT1, IFIT2 e IFIT3; 4. Monocitos IL1B (grupos #15) implicados en inflamación; 5. Macrófagos HES1 (grupo #2) que se caracterizan por una firma genética asociada con células residentes a largo plazo; 6. Macrófagos TREM2 (grupo #3); 7. Macrófagos IL4I1 (grupos #6, #7, #13, #16) que se asocian con funciones inmunosupresoras, especialmente en la periferia del tumor; 8. Macrófagos FTL (grupo #17) que se caracterizan por una firma génica relacionada con el metabolismo del hierro; 9. Macrófagos alveolares (grupo #16) que expresan genes como C1QA/B/C y MHC clase II; 10. Macrófagos proliferantes (grupo #10) que representa células en división, lo que sugiere una población activa en la respuesta inmune; 11. Contaminación por células dendríticas (grupo #14); y 12. Dobletes de Células MNP/T (grupo #9). En la comparación con las subpoblaciones identificadas en este estudio se observó que los Upa-GM-MØ son similares a los macrófagos HES1 (grupo #2), que comparten características con los macrófagos TREM2 (grupo #3) y que están definidos por genes comúnmente asociados con el perfil de los M-MØ. Estos genes también se expresan en las subpoblaciones de macrófagos de tejido sinovial (STMs) propuestas por *Alivernini et al.* (TREM2^{high}, 1; y FOLR2^{high}LYVE1^{pos}, 5). Por su lado, *Dick et al.*, utilizando scRNA-seq, encontraron que cuatro genes (*LYVE1*, *FOLR2*, *CCR2* y *MHCII*) predicen la presencia de tres

DISCUSIÓN

subpoblaciones de macrófagos residentes en el corazón, hígado, pulmón, riñón y cerebro de ratones. Cuando comparamos el perfil transcriptómico de los Upa-GM-MØ con este estudio observamos que el perfil transcriptómico de los macrófagos residentes de tejido (TRMs) de corazón que expresan *FOLR2*, *LYVE1* y *CD163* fue el más parecido significativamente, mostrando además unos valores de enriquecimiento similares para esta misma subpoblación de TRMs en hígado, pulmón y riñón. Todo ello indica que los Upa-GM-MØ o Bari-GM-Mo adquieren el perfil antiinflamatorio característico de macrófagos residentes de diferentes tejidos, y esto apoya el efecto terapéutico de los JAKi sobre macrófagos sinoviales de pacientes con RA. Además, la coincidencia de expresión de genes de perfil antiinflamatorio entre los tres estudios de scRNA-seq y nuestro estudio transcriptómico indica que los JAKi estarían cumpliendo su papel antiinflamatorio al limitar la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias que contribuyen a la sinovitis de los pacientes con RA, como *IL6*, *IL1B*, *TNF* o *CSF2*.

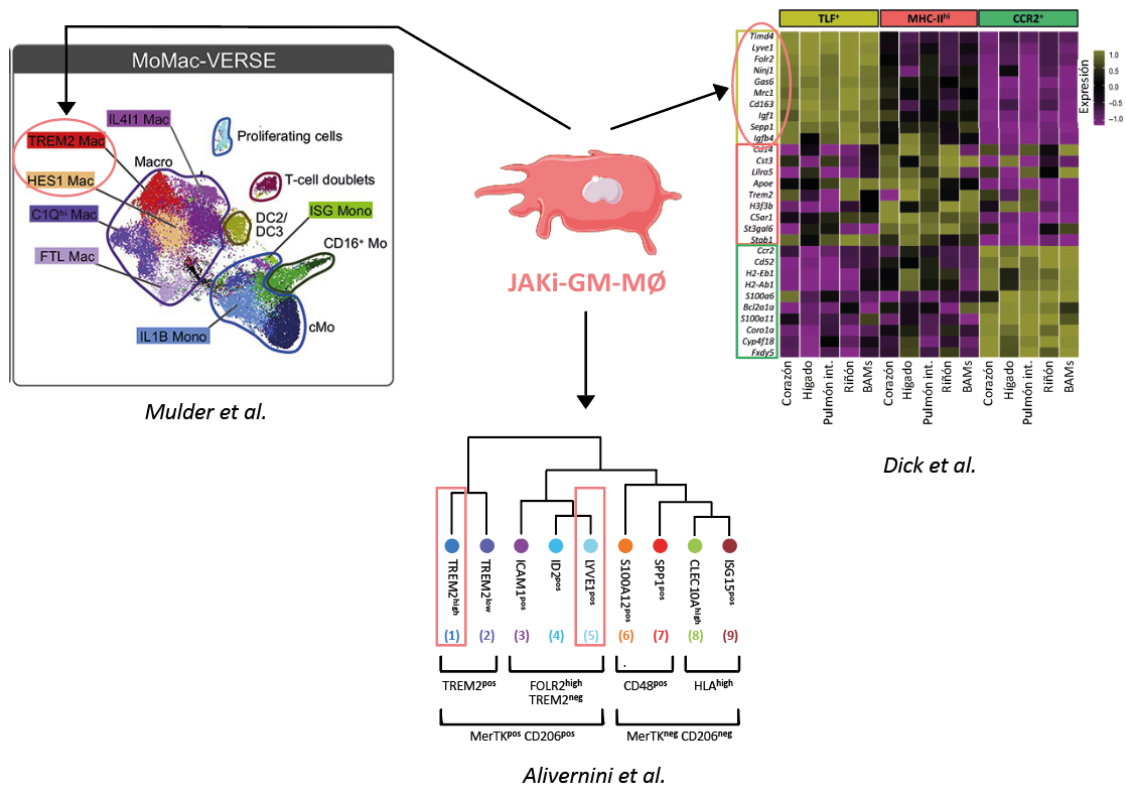


Figura 12. Comparación del perfil transcriptómico de los macrófagos tratados con JAKi (JAKi-GM-MØ) frente a las subpoblaciones de macrófagos residentes de tejido descritas por diferentes autores ^{165,278,279}. Los JAKi-GM-MØ muestran un perfil transcriptómico similar al de diferentes subpoblaciones de macrófagos homeostáticos residentes de tejido.

Si bien las técnicas de análisis transcriptómico han mostrado ser muy útiles para el estudio del transcriptoma de subpoblaciones celulares concretas en diversos contextos, no reflejan los cambios epigenéticos que pueden estar regulando la expresión de ciertos genes que den lugar a cambios en el fenotipo de las células estudiadas. La epigenética comprende el estudio de las modificaciones genéticas (metilaciones, acetilaciones) que activan o

inactivan a los genes sin cambiar la secuencia de DNA debidas a factores ambientales o al envejecimiento, y que pueden modificar el riesgo a padecer determinadas enfermedades como la RA ²⁸⁰. Interesantemente, hace tiempo que se sabe que los cambios en la metilación y la acetilación de histonas pueden modular la expresión de genes implicados en el proceso de diferenciación y función de los macrófagos ²⁸¹. La activación de la DNA metiltransferasa 3B (DNMT3B) y la inactivación de la histona desacetilasa 3 (HDAC3) promueven la transcripción de genes implicados en la polarización de macrófagos de perfil antiinflamatorio en respuesta a IL-4. En el caso de la respuesta a IFN- γ , aumenta la forma trimetilada de la lisina 27 de la H3 (H3K27) y reprime la expresión de genes antiinflamatorios dependientes de MAF en macrófagos de ratón, lo que explica el papel de esta citoquina en la diferenciación de macrófagos de perfil proinflamatorio ²⁸². Recientemente se ha descrito la lactilación de histonas como una nueva modificación postranscripcional en macrófagos derivados de monocitos de médula ósea de ratón ²⁷⁹. Esta modificación consiste en la lactilación de lisinas (Kla) de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, mediada presumiblemente por p300. En macrófagos proinflamatorios murinos (derivados de monocitos estimulados con LPS más IFN- γ), las marcas Kla van acumulándose con el tiempo y sirven de freno para la escalada proinflamatoria, ya que existe una relación directa entre la acumulación de marcas Kla y el aumento de expresión de genes de perfil antiinflamatorio como *Arg1* ^{283,284}. Este proceso es dependiente de la acumulación del lactato generado por el aumento de la tasa glucolítica en los macrófagos de perfil proinflamatorio M1. En esta tesis se explora el efecto del upadacitinib sobre las tasas de consumo metabólico, detectándose que los Upa-GM-M \emptyset tienen una menor tasa de consumo de oxígeno y una menor tasa glucolítica, lo que se traduce en una menor producción de lactato que los macrófagos control GM-M \emptyset . Estos resultados sugieren que los Upa-GM-M \emptyset deberían acumular menos marcas Kla en las histonas que los GM-M \emptyset . Experimentos preliminares de estudio de marcas de lactilación de histonas de los Upa-GM-M \emptyset indican que no acumulan marcas Kla. Ambos resultados coinciden con lo descrito por *Zhang et al.* ²⁸³, en cuanto a que los macrófagos de perfil antiinflamatorio no acumulan marcas Kla y producen menos lactato, y evidencia la capacidad reprogramadora del upadacitinib sobre macrófagos proinflamatorios. Una mayor investigación sobre los mecanismos que regulan la adquisición de las marcas Kla y su relación con las funciones de los macrófagos de perfil proinflamatorio podría abrir nuevas rutas de tratamiento enfocadas en la modulación epigenética, siendo muy importante en el contexto proinflamatorio de la RA.

b) HD-MTX

Los estudios de secuenciación de mRNA en cáncer también han mostrado la heterogeneidad de subpoblaciones de TAMs presentes en el microambiente tumoral ¹²². En el caso del estudio del efecto del fármaco antitumoral MTX en macrófagos, nuestros resultados muestran que el empleo de HD-MTX reprograma a los M-M \emptyset hacia un perfil transcriptómico similar al de macrófagos con actividad antitumoral y perfil proinflamatorio. Para contextualizar con macrófagos de tejido tumoral *in vivo*, realizamos una comparación con los grupos de genes que definen dos subpoblaciones de TAMs (TAMs “pequeños” y TAMs “grandes”) identificadas por scRNA-seq en la metástasis de hígado de cáncer colorrectal por *Donadon et al* ¹²¹. Se observó una similitud muy significativa con el grupo de genes que define a la subpoblación de TAMs “pequeños” asociados con buen pronóstico y la expresión de genes antitumorales ¹²¹. Estos resultados indican que el tratamiento con HD-MTX

favorece la reprogramación de M-MØ hacia el perfil de TAMs antitumorales hallados en el microambiente tumoral de la metástasis de hígado de cáncer colorrectal *in vivo*.

Otro ejemplo de fármaco antitumoral que reprograma a los macrófagos es el 5-Fluorouracilo empleado en la terapia frente al cáncer colorrectal. Este fármaco no solo actúa sobre las células tumorales, sino que también modifica la actividad y la polarización de los TAMs, aumentando su capacidad citotóxica e incrementando la expresión de genes de perfil proinflamatorio como HLA-DR, mejorando la respuesta al tratamiento y dando lugar a una mejoría clínica en pacientes con cáncer colorrectal ²⁸⁵. Al igual que MTX, el 5-Fluorouracilo es inhibidor de la TS, lo que sugiere que ambos fármacos pueden compartir mecanismos moleculares de reprogramación en macrófagos. De hecho, hace tiempo que se conoce que el tratamiento combinado de estos fármacos mejora la respuesta clínica de pacientes con cáncer colorrectal que son resistentes al tratamiento con 5-Fluorouracilo, debido a una mayor retención de los metabolitos activos del MTX ²⁸⁶. No obstante, un estudio realizado en la línea de células tumorales de cáncer colorrectal HCT116, mostró que las células HCT116 transfectadas con *MAF* presentaban una mayor sensibilidad y una mayor tasa de apoptosis inducida por el 5-Fluorouracilo que las transfectadas con un vector control ²⁸⁷. Los resultados presentados en esta tesis muestran que en M-MØ el tratamiento con HD-MTX reduce la expresión proteica de *MAF*. Estos datos sugieren que en el tratamiento combinado con 5-Fluorouracilo y HD-MTX, el MTX podría reducir la expresión de *MAF*. Aunque *MAF* parece ser necesario para una buena respuesta al 5-Fluorouracilo ²⁸⁷ también está implicado en la adquisición del perfil protumoral en los TAMs ⁷⁷. Por tanto, nuestros resultados podrían explicar parcialmente la eficacia del tratamiento combinado con 5-Fluorouracilo y HD-MTX en el contexto del cáncer colorrectal, ya que los M-MØ tratados con HD-MTX *in vitro* comparten el perfil transcriptómico de los TAMs “pequeños” de perfil antitumoral hallados en los pacientes con metástasis de hígado de cáncer colorrectal de mejor pronóstico.

Efecto de los fármacos JAKi y HD-MTX sobre la reprogramación bioquímica de macrófagos

a) JAKi

El eje de señalización GM-CSF/GM-CSFR/JAK2 es importante en la diferenciación de monocitos hacia macrófagos de perfil proinflamatorio y juega un papel crucial en la etiopatogenia de la RA ^{34,288}. El GM-CSF a través de GM-CSFR activa JAK2 que modula, entre otras, la señalización de las rutas PI3K-Akt y MEK-ERK. Tanto la ruta PI3K-Akt ²⁸⁹ como la ruta MEK-ERK ²⁹⁰ son reguladoras negativas de la quinasa GSK3, enzima con dos isoformas en humanos (α y β), que está implicada en diferentes procesos celulares, entre los que se encuentra la respuesta inflamatoria. GSK3 β se encuentra activa de forma constitutiva cuando está fosforilada en la Tyr216. Sin embargo, la fosforilación de GSK3 β en Ser9 es inhibitoria ya que impide que el sustrato ingrese al sitio activo del dominio quinasa ⁷⁹. Los estudios sobre la función de GSK3 han demostrado que posee más de cien sustratos ²⁹⁰, entre los que se encuentra MAFB, *MAF*, *MAFA*, HIF1- α , p53 y la piruvato deshidrogenasa (PDH) ^{77,291}. Por tanto, existe una relación entre la activación de JAK2 por la unión de GM-CSF a su receptor, la activación de las rutas PI3K-Akt y MEK-ERK (una subruta de las MAPK), la regulación de GSK3 y la actividad de MAFB. De acuerdo con todo lo anterior, en los GM-

MØ debería observarse la inhibición de GSK3β vía PI3K-Akt y MEK-ERK. No obstante, en los resultados de esta tesis, no se observa dicha inhibición sobre los GM-MØ. Además, la forma inactiva de GSK3β aumenta su expresión cuando se inhibe la señalización del GM-CSF por los JAKi, lo que correlaciona con el aumento observado en la expresión proteica de MAFB. Para comprobar si la inhibición de la ruta MEK-ERK, a través de ERK2²⁹², ejerce un efecto sobre la expresión de MAFB, se empleó el inhibidor específico de ERK, U0126, en monocitos estimulados con GM-CSF, y se observó que el bloqueo de ERK no es suficiente para producir un aumento significativo en la expresión proteica de MAFB. Esto sugiere que el tratamiento con JAKi solo explica parcialmente el aumento de la forma inactiva de GSK3β y de MAFB a través de la ruta MEK-ERK, dando lugar a la posibilidad de que existan otras rutas que regulen a GSK3 que se afecten de manera indirecta por los JAKi, como la ruta de mTOR²⁹³ (Fig. 13).

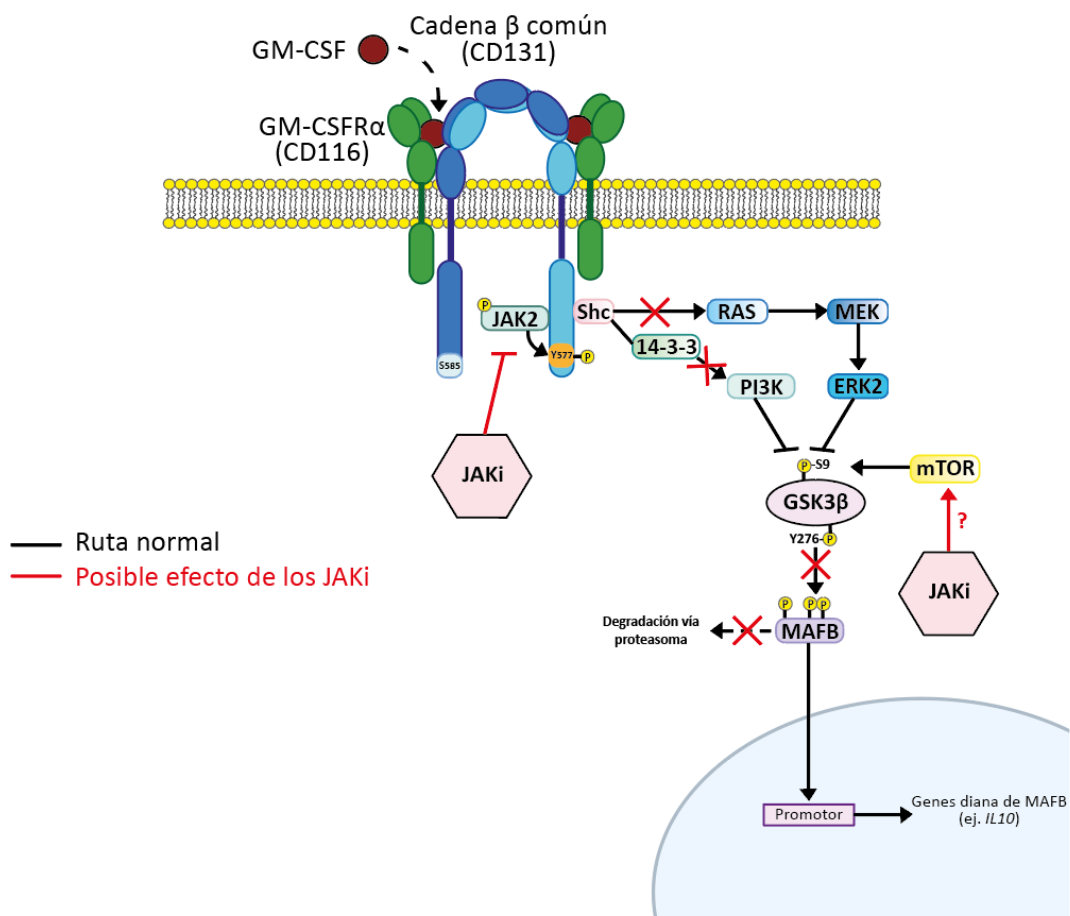


Figura 13. Esquema de la posible relación entre la inhibición de JAK2 y la regulación de GSK3β. Adaptada de ⁸⁶. Los JAKi inhiben la señalización del eje GM-CSF/GM-CSFR por su unión a JAK2. Además, las rutas PI3K-Akt y MEK-ERK, activadas por la señalización del GM-CSF a través de JAK2, son reguladoras negativas de GSK3β. A su vez, MAFB es sustrato de GSK3β y es degradado vía proteasoma tras la fosforilación múltiple por esta quinasa. La inhibición ejercida por los JAKi sobre JAK2 no explica completamente el aumento observado de la forma inactiva de GSK3β (p-s9) ni el aumento de MAFB en los Upa-GM-MØ, por lo que otras rutas reguladoras de GSK3β, como mTOR, podrían verse afectadas de manera indirecta por los JAKi.

Los factores de transcripción MAFB y MAF, miembros de la familia de factores de transcripción AP-1, están implicados en la adquisición del perfil antiinflamatorio en macrófagos^{32,68,70}. MAFB es fosforilado inicialmente por una quinasa (denominada *priming kinase*), aún por descubrir, que lo activa y convierte en sustrato para GSK3. GSK3 puede fosforilar a MAFB en diferentes residuos que lo marcan para su degradación. Cuando GSK3 β es fosforilado en la Ser9, se inactiva y permite que MAFB se mantenga activo⁷⁷. Esto aumenta la concentración de MAFB en el interior de la célula promoviendo la transcripción de sus genes diana con perfil antiinflamatorio. Aunque MAF y MAFB comparten mecanismos de regulación como la fosforilación mediada por la quinasa GSK3⁷⁷, nuestros resultados indican que el aumento de la forma inactiva de GSK3 β tras el tratamiento con upadacitinib no se correlaciona con la expresión de *MAF*, pero sí con el aumento de expresión de *MAFB*. Esto sugiere que MAF y MAFB pueden tener otros reguladores específicos que aún no han sido identificados y abre un campo de investigación muy importante en la terapia dirigida a la reprogramación, específicamente mediante el control de MAF y MAFB en macrófagos.

Un factor novedoso de los JAKi es su capacidad para inhibir de manera selectiva a un JAK concreto. En la práctica esta selectividad se ve truncada por las dosis empleadas en los pacientes, dando lugar a que haya más de un JAK inhibido. Esto es debido a que sus dominios quinasa se han conservado evolutivamente y son muy similares¹⁹⁶, y explica porque upadacitinib, que es selectivo para JAK1, ejerce efectos sobre JAK2 a las dosis empleadas en los ensayos realizados. A pesar de la diferente especificidad de los JAKi por JAK1/2/3/TYK2, nuestros resultados indican que el empleo de los JAKi upadacitinib, baricitinib, tofacitinib, peficitinib y filgotinib aumentan, de manera dosis-dependiente, la expresión de MAFB y CD163 en monocitos estimulados con GM-CSF. De hecho, el silenciamiento de *MAFB* indica la dependencia de este factor de transcripción en el efecto de reprogramación inducido por upadacitinib en la diferenciación de monocitos a macrófagos. El aumento de expresión de MAFB no fue observado cuando los monocitos estimulados con GM-CSF fueron tratados con el JAKi deucravacitinib, inhibidor específico de TYK2. La mayoría de JAKi se unen de manera específica al sitio de unión a ATP localizado en el dominio quinasa conservado entre todos los JAK. Otros JAKi, como el deucravacitinib, se unen a un sitio de regulación alostérica localizado en el dominio pseudoquinasa²⁴⁷. Esto indica que el dominio quinasa de JAK2 asociado al GM-CSFR es clave en la reprogramación de macrófagos y en la regulación de MAFB.

b) HD-MTX

Estudios anteriores del grupo y otros autores han determinado el perfil transcriptómico y funcional de los M-M \emptyset . Estos macrófagos muestran un perfil antiinflamatorio dependiente de los factores MAF y MAFB^{32,68,70}. Cuando tratamos a los M-M \emptyset con HD-MTX, observamos una disminución en la expresión proteica de MAF y MAFB. Como se ha comentado anteriormente, GSK3 regula la degradación de MAF y MAFB, por lo que se usó el inhibidor de GSK3, CHIR99021, en los MTX-M-M \emptyset para evaluar la relación entre los efectos de HD-MTX y GSK3. Se observó una recuperación de la expresión proteica de MAFB, una menor expresión de los genes dependientes de MTX (*GDF15*, *LIF*) y de los genes proinflamatorios *INHBA* e *IL1B*, y una menor acumulación de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en el medio de cultivo. Esto confirma la relación entre GSK3 y MAFB, y sugiere que los efectos de HD-MTX son dependientes de GSK3. El aumento en la expresión de MAFB en los M-M \emptyset y en los MTX-M-M \emptyset tratados con CHIR99021 puede estar

relacionado con la señalización por M-CSF/CSF1R, puesto que se ha descrito que activa a PI3K γ ²⁸⁹, regulador negativo de GSK3. De esta manera, GSK3 se encuentra inactivo en los M-M \emptyset y esto aumenta la actividad y concentración de MAFB. El caso de los MTX-M-M \emptyset tratados con CHIR99021 es más complejo, puesto que no se ha dilucidado como ejerce HD-MTX sus efectos sobre GSK3. En principio, HD-MTX pueden estar bloqueando alguna ruta de señalización que regule a GSK3, como PI3K-Akt o MEK-ERK, permitiendo que GSK3 se mantenga activa. El empleo del inhibidor de GSK3 puede bloquear el efecto de HD-MTX en los M-M \emptyset y así restablecer el perfil antiinflamatorio en los MTX-M-M \emptyset . Este resultado en M-M \emptyset coincide con los resultados de los GM-M \emptyset tratados con JAKi, lo que enfatiza aún más el papel que posee la ruta PI3K-Akt/MAFB sobre la reprogramación de macrófagos.

En glioblastoma se está estudiando el efecto del inhibidor del CSF1R, BLZ945, sobre los TAMs²⁹⁴. En modelos preclínicos, la inhibición del CSF1R redujo el número de TAMs y el crecimiento tumoral, e incrementó la respuesta a la quimioterapia^{295,296}. El inhibidor BLZ945 indujo una reprogramación en los TAMs hacia un perfil antitumoral mostrando una menor expresión de genes protumorales y un aumento en la expresión de genes asociados con la presentación de antígenos y la activación de linfocitos. Desde el punto de vista funcional, BLZ945 aumentó las interacciones entre TAMs y linfocitos T productores de IFN- γ favoreciendo su actividad antitumoral^{294,297}. Los efectos observados con esta estrategia coinciden con el aumento de genes proinflamatorios asociados con las firmas "INTERFERON-GAMMA-RESPONSE" y "INFLAMMATORY RESPONSE" y con la menor expresión de la forma fosforilada del CSF1R observada en nuestros resultados con los MTX-M-M \emptyset . Incluso es esperable que esto también suceda con dosis altas de pemetrexed (HD-PMX), ya que este tratamiento aumenta la expresión del gen *INHBA*, necesario para la adquisición del perfil proinflamatorio en macrófagos^{40,53,275}, y reduce la expresión de MAFB^{32,68,70}. Nuestros resultados apuntan a un papel esencial de MAFB y de la regulación de la ruta M-CSF/CSF1R en el efecto reprogramador de HD-MTX, por lo que también podría plantearse que ambos factores estén implicados en la reprogramación inducida por BLZ945. Ya que existen otros antifolatos que también se usan como estrategia antitumoral, como el pemetrexed (PMX), podría ampliarse el estudio para determinar cómo afectan a la señalización por la ruta M-CSF/CSF1R.

En su conjunto, estos resultados asocian el efecto reprogramador del MTX y los JAKi sobre los macrófagos a la expresión y regulación de MAF y MAFB mediada por la señalización dependiente de las citoquinas M-CSF y GM-CSF.

Efecto de los fármacos JAKi y HD-MTX sobre la reprogramación funcional

a) Fagocitosis en macrófagos tratados con JAKi

Entre las funciones características de los macrófagos se encuentra la fagocitosis. La fagocitosis es un proceso a través del cual los macrófagos pueden eliminar patógenos infecciosos y células muertas, contribuyendo así a la resolución de la inflamación y a la homeostasis del tejido. La eferocitosis es un tipo especializado de fagocitosis que se encarga específicamente de la eliminación de células apoptóticas. Los M-M \emptyset realizan la eferocitosis de manera similar a los macrófagos de membrana sinovial sana, según se ha descrito por

diferentes autores en modelos de ratón ^{298,299} y en humano ^{300,301}. En el estudio de *Waterborg et al.* ²⁹⁸, utilizan dos modelos de ratón que desarrollan RA y un modelo *in vitro* con organoides sinoviales tridimensionales humanos que se asemejan a la membrana sinovial. Este trabajo asocia la activación de MerTK en los macrófagos murinos y en los organoides, con la función eferocítica normal llevada a cabo por los macrófagos de la membrana sinovial sana, lo que otorga a estas células un papel protector frente a la inflamación tisular. Interesantemente, una mayor concentración de la forma soluble de MerTK en suero de pacientes con RA correlaciona con un menor índice de actividad de la enfermedad y con menor destrucción ósea ³⁰². Además, la eferocitosis estimula la proliferación de MDMs de ratón y humanos *in vitro*, lo que apoyaría su participación en el proceso de resolución de la inflamación *in vivo* ³⁰³. Los resultados de esta tesis han confirmado que tanto la fagocitosis de *Escherichia coli* como la eferocitosis de células apoptóticas *in vitro* es mayor en los M-MØ que en los GM-MØ. Por su lado, los Upa-GM-MØ mostraron dos poblaciones de macrófagos, una con elevada actividad fagocítica y eferocítica, y otra con menor actividad. Esto indica que upadacitinib es capaz de modificar la fagocitosis y eferocitosis de los GM-MØ. Además, dado que los Upa-GM-MØ muestran un perfil transcriptómico similar al de los grupos fenotípicos 1 y 5 de macrófagos de tejido sinovial descritos por *Alivernini et al.*, (**Fig. 12**), con los que comparte una elevada expresión de *MERTK*, esto sugiere que el tratamiento con upadacitinib podría estimular la capacidad eferocítica de los macrófagos de membrana sinovial de pacientes con RA y aumentar su proliferación, disminuyendo la sinovitis y contribuyendo a resolver el proceso inflamatorio.

El proceso de eferocitosis es muy complejo y depende de la expresión y/o liberación de señales “cómeme” (*eat-me signals*), como fosfatidilserina, nucleótidos extracelulares o CX3CL1, por aquellas células que inician el programa de apoptosis. Los macrófagos expresan en su membrana receptores capaces de reconocer estas señales, como TIM1, estabilina 2 o CX3CR1. La eferocitosis es esencial para mantener la homeostasis, y evita la acumulación de células apoptóticas que pueden dar lugar al desarrollo de enfermedades autoinmunes ³⁰⁴. En este sentido, un estudio realizado en ratones ha demostrado que el defecto de C1q, un componente del sistema del complemento necesario para la eferocitosis, disminuye la capacidad de eliminar células apoptóticas ³⁰⁵. Adicionalmente, demuestran que *Mafb* regula la expresión de C1q en monocitos y macrófagos murinos, y ratones deficientes para *Mafb* muestran baja actividad eferocítica, lo que podría tener relación con el desarrollo de enfermedades autoinmunes en estos ratones. En base a estas investigaciones, el aumento de expresión proteica de MAFB observada en los resultados de esta tesis en los Upa-GM-MØ podría ser responsable del aumento de la actividad eferocítica de estos macrófagos. Respecto a la expresión de C1q, si bien no hemos cuantificado la expresión proteica, en el transcriptoma de los Upa-GM-MØ la expresión de mRNA de *C1QA* se encuentra reducida, la de *C1QC* está aumentada, y tanto la expresión de *C1QB* como la de *C1QBP* no muestran cambios significativos (datos no mostrados). Aún desconocemos los mecanismos implicados en el aumento de la capacidad eferocítica de los Upa-GM-MØ, pero el estudio de las proteínas implicadas en este proceso como C1q, o de los receptores que reconocen señales que inician la eferocitosis, como MFG8 ^{306,307} o MerTK ^{298,308}, podría arrojar luz sobre este aspecto funcional.

b) Citoquinas en respuesta a señales de peligro (PAMPs y DAMPs) en macrófagos tratados con JAKi y HD-MTX

Otra actividad funcional evaluada en los macrófagos que han sido tratados con fármacos es la producción de citoquinas en respuesta a señales de peligro, como el LPS o los nucleótidos extracelulares. De manera general, los GM-MØ se caracterizan por la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 en respuesta a LPS, mientras que los M-MØ producen la citoquina antiinflamatoria IL-10 de manera específica^{38-40,69}. En el caso de los JAKi upadacitinib y baricitinib, se detectó una disminución en la producción de IL-6 y TNF- α y un aumento de IL-10 en respuesta a LPS en los JAKi-GM-MØ respecto a los GM-MØ. En el contexto de la RA, el tratamiento con JAKi disminuye la exacerbación del proceso inflamatorio reduciendo la activación de los receptores de citoquinas que participan en el proceso inflamatorio, ya que se encuentran asociados a JAKs en la región citosólica⁸⁶. Esto promueve la recuperación de la homeostasis tisular y forma parte de la remisión de los síntomas de los pacientes. Dado que, en la práctica clínica habitual de pacientes con RA es común que LD-MTX y JAKi coincidan en la pauta de tratamiento²⁴⁴, planteamos utilizar la combinación de ambos fármacos en macrófagos GM-MØ para evaluar los efectos sobre la reprogramación desde el punto de vista funcional. Análisis preliminares mostraron que los GM-MØ tratados con ambos fármacos aumentaron, de manera moderada, la producción de IL-10 en respuesta a LPS, en comparación a los GM-MØ tratados solo con upadacitinib (datos no publicados). A pesar del aumento de concentración de IL-10 en los sobrenadantes de los JAKi-GM-MØ y de los JAKi-GM-MØ tratados con LD-MTX, no podemos asegurar que esta citoquina ejerza sus efectos, debido a que su receptor (IL-10R) se encuentra asociado a JAKs, concretamente JAK1 y TYK2. TYK2 no se ve afectado por el efecto de los JAKi aprobados para la RA, pero JAK1 es imprescindible para la señalización del IL-10R y sí es diana de estos JAKi^{211,309}. Por lo que estos resultados sugieren que el tratamiento con JAKi, solo o en combinación con LD-MTX, puede inducir una reprogramación antiinflamatoria en GM-MØ, que podría ser beneficioso para reducir la inflamación y promover la homeostasis tisular en pacientes con RA, pero sería necesario estudiar con detalle la señalización de IL-10 para comprobar si su señalización es funcional.

La IL-10 es de interés debido a que es la citoquina antiinflamatoria principal implicada en la resolución de la inflamación y, en el contexto tumoral, es responsable de limitar la respuesta del sistema inmunitario frente a las células tumorales^{70,310}. Los MTX-M-MØ estimulados con LPS mostraron una menor producción de IL-10 y una mayor producción de IFN β 1 y de IL-6 que los M-MØ control estimulados con LPS, lo que sugiere que HD-MTX promueven una respuesta proinflamatoria en respuesta a PAMPs. Se empleó LPS en estos ensayos porque es un activador de TLR4 y los macrófagos lo expresan en su membrana^{52,311}, por lo que permite comprobar cómo es su perfil funcional en diferentes condiciones. No obstante, el LPS no es un estímulo que se encuentre presente en el microambiente tumoral. En base a esto, decidimos testar también la respuesta a otras señales de peligro, en este caso DAMP, como el análogo del monofosfato cíclico de diadenilo (c-di-AMP), 2',3'-monofosfato cíclico de GMP-AMP (2'-3'-cGAMP). Esta molécula es un dinucleótido producido por la enzima sintasa de GMP-AMP cíclico (cGAS) a partir del DNA dañado derivado de la inestabilidad cromosómica presente en las células tumorales³¹²⁻³¹⁴. El cGAMP liberado de la célula tumoral es reconocido e internalizado por macrófagos, donde se une a la proteína estimuladora de genes de interferón (STING), un receptor del retículo endoplasmático, que promueve la producción de citoquinas proinflamatorias a través de la activación de IRF3 vía TBK1³¹⁵. La activación de STING y el subsecuente aumento de la

producción de interferón de tipo I ha sido muy relevante en la investigación contra el cáncer ^{316,317}. Interesantemente, STING también es activado por el c-di-AMP derivado de la microbiota intestinal, que regula la polarización de los macrófagos y la producción de interferón ³¹⁸. Cuando estimulamos con 2'-3'-cGAMP a MTX-M-MØ observamos resultados similares a los obtenidos con LPS, ya que activa STING y la producción de las citoquinas proinflamatorias IFN β 1 e IL-6. Estos resultados indican que el tratamiento con HD-MTX posee un gran potencial como estrategia reprogramadora de las funciones de los TAMs inmunosupresores hacia un perfil antitumoral.

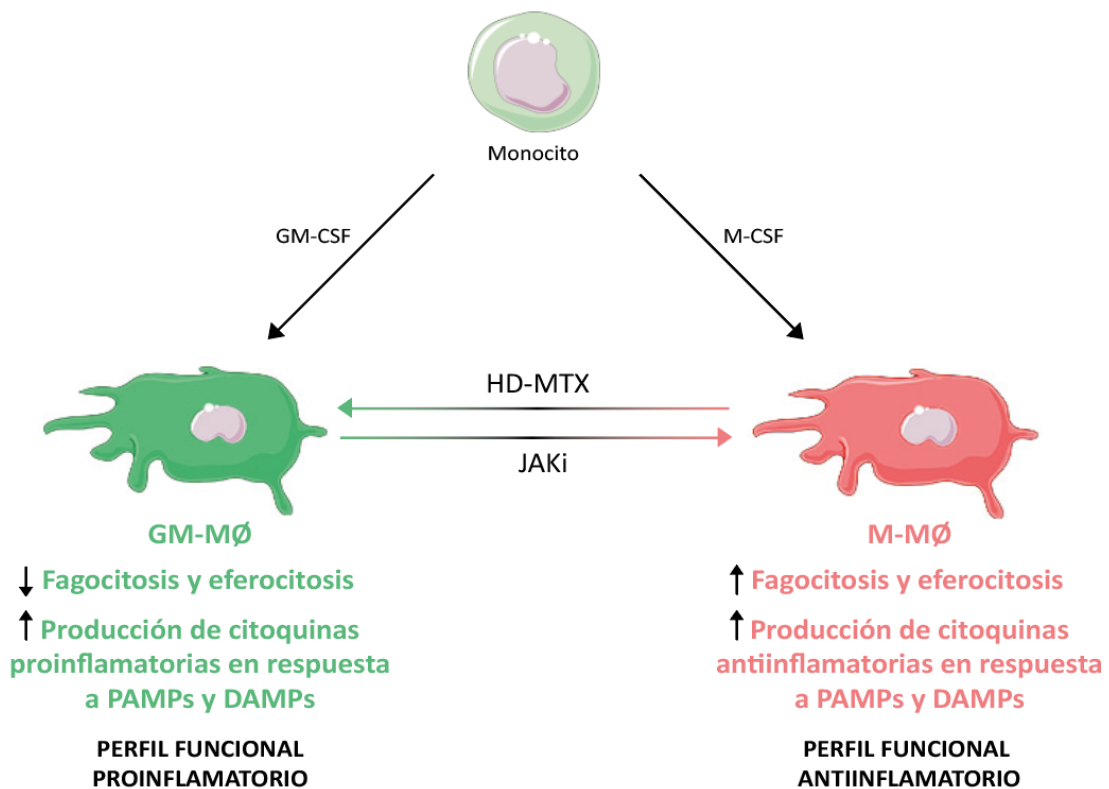


Figura 14. Esquema del efecto de los fármacos HD-MTX y JAKi sobre el perfil funcional de los macrófagos derivados de monocitos. Similar a los resultados observados sobre el perfil transcriptómico y bioquímico, el HD-MTX favorece la adquisición de funciones proinflamatorias en los M-MØ; mientras que los JAKi favorecen la adquisición de funciones antiinflamatorias en los GM-MØ.

Los resultados obtenidos en los M-MØ tratados con HD-MTX indican que GSK3 β y su regulación sobre los factores de transcripción MAFB/MAF, podría ser una nueva diana terapéutica en las estrategias antitumorales, ya que induce una reprogramación desde el punto de vista transcripcional, bioquímico y funcional. Sin embargo, la limitación principal del estudio reside en que solo se han analizado los efectos sobre los M-MØ generados *in vitro*, por lo que existe la posibilidad de que otros mecanismos adicionales al efecto de HD-MTX sobre la diferenciación mediada por MAFB/MAF, puedan estar implicados *in vivo*. El estudio de los efectos de HD-MTX sobre macrófagos aislados *ex vivo* de tejido tumoral podría arrojar luz sobre la reprogramación de TAMs *in vivo*. Además, el estudio del efecto de HD-MTX en macrófagos cocultivados con líneas celulares tumorales podría simular los efectos

del microambiente tumoral *in vivo*, y permitir una mejor comprensión del efecto reprogramador de HD-MTX en TAMs.

Efecto de los JAKi sobre la reprogramación de monocitos *in vivo*

Diferentes estudios han mostrado que los pacientes con RA presentan un desbalance en las subpoblaciones de monocitos, lo que es un reflejo del estado de inflamación crónico característico en estos pacientes ^{319,320}. En el marco del estudio observacional JAKi_MONOMAC iniciado por nuestro grupo durante la realización de esta tesis, hemos medido mediante citometría de flujo la frecuencia de monocitos de sangre periférica en pacientes con RA activa que no responden a la terapia convencional con LD-MTX o bDMARDs, antes y tres meses después de comenzar tratamiento con el JAKi upadacitinib, y la hemos comparado con sujetos sanos. Los resultados obtenidos (**Fig. 15**) indican que tres meses de tratamiento con upadacitinib restauran las subpoblaciones de monocitos de sangre periférica (clásicos, intermedios y no clásicos) en los pacientes con RA (90%, 6% y 4%) a frecuencias similares a las observadas en individuos sanos (85%, 5% y 10%, respectivamente) ³²¹. Este resultado implica que, tras el tratamiento con JAKi, habría una menor proporción de monocitos clásicos que se extravasan a la membrana sinovial inflamada y una mayor proporción de monocitos no clásicos en sangre, lo que contribuiría a la desescalada del proceso inflamatorio. Estos datos concuerdan con el cambio transcripcional en el análisis de la secuenciación del RNA (RNAseq) realizado con la población completa de monocitos CD14⁺ de esos mismos pacientes, antes y tres meses después del tratamiento con upadacitinib. Los resultados indican un aumento en la expresión de genes que definen a la población de monocitos no clásicos (CD16⁺) tras el tratamiento. Existen, sin embargo, otros estudios en los que la frecuencia de las subpoblaciones de monocitos de sangre periférica de pacientes con RA activa son diferentes a los observados en los pacientes con RA activa reclutados en nuestro estudio (antes de comenzar el tratamiento con upadacitinib). En estos estudios se encuentran aumentados los monocitos intermedios (15-23%), disminuidos los monocitos clásicos (65-70%) y sin cambios en los monocitos no clásicos (7-10%) ³²²⁻³²⁴. A pesar de esta discrepancia entre los datos ofrecidos por diferentes autores en la literatura y nuestros resultados, hay que destacar que el tamaño muestral de nuestro estudio es muy bajo ($n=3$), por lo que los resultados son preliminares y todavía no es representativo. Además, todos los pacientes reclutados en nuestro estudio han sido tratados previamente con diferentes DMARDs lo que podría afectar a las frecuencias de las subpoblaciones, y a los parámetros que miden la inflamación sistémica y el índice de actividad de la enfermedad, en comparación con los pacientes reclutados en los otros estudios ³²²⁻³²⁴ en los que o no habían sido tratados con ningún fármaco antes de tomar la muestra, o había unos pocos tratados con MTX, antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), bDMARDs u otros DMARDs. Por último, la estrategia de selección de las poblaciones en JAKi-MONOMAC por citometría de flujo incluye la separación de la población CD16⁺ en función de la expresión de HLA-DR, un factor que no tienen en cuenta los mencionados estudios. Por todo ello, es posible que existan diferencias en la literatura debido a una falta de normalización de la estrategia de selección de las poblaciones de monocitos, y por diferencias en las características basales de los pacientes reclutados en los estudios observacionales.

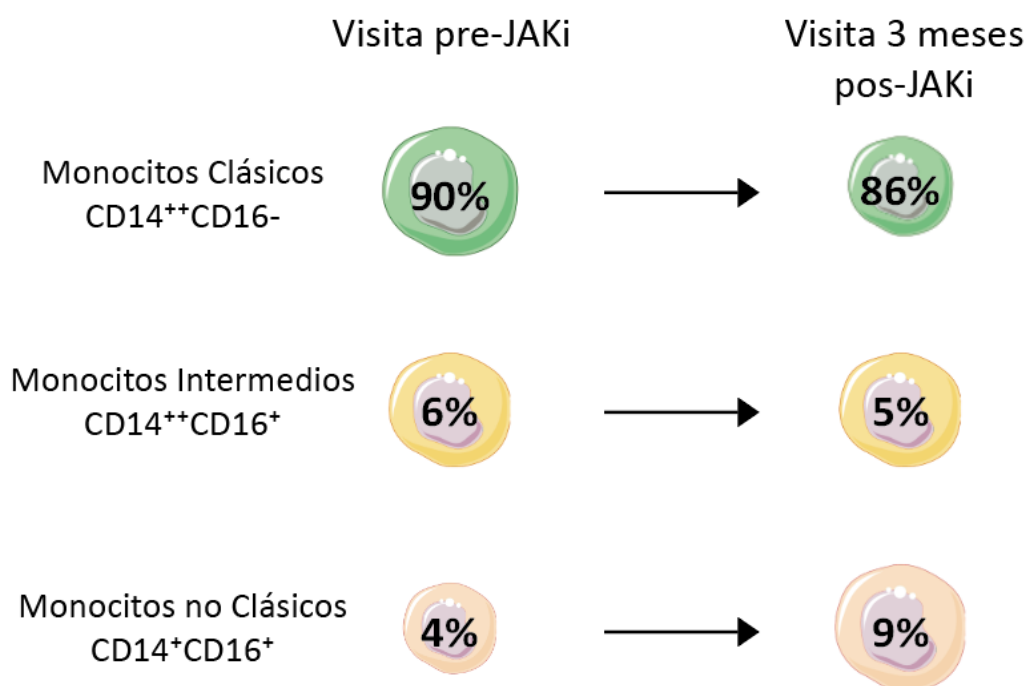


Figura 15. Esquema del efecto de los JAKi sobre la frecuencia de las subpoblaciones de monocitos de sangre periférica. Los pacientes con RA activa tras tres meses de tratamiento con JAKi recuperan la frecuencia de las subpoblaciones de monocitos a proporciones similares a las encontradas en individuos sanos o pacientes en remisión.

Adicionalmente, y dado que realizamos un RNAseq con la población completa de monocitos CD14⁺ del estudio JAKi-MONOMAC, comparamos el perfil transcriptómico de la población CD14⁺ de los pacientes con los genes que definen a los nueve grupos fenotípicos de macrófagos descritos por *Alivernini et al.* Los resultados indicaron que tras tres meses de tratamiento con upadacitinib los monocitos se asemejan al grupo de macrófagos residentes de tejido sinovial TREM2^{high} (1) y al de macrófagos infiltrados al tejido sinovial HLA^{high}CLEC10A^{high} (8), al igual que ocurre en los Upa-GM-MØ generados *in vitro*. Este resultado sugiere que el tratamiento con upadacitinib promovería un cambio transcriptómico en los monocitos de sangre periférica que van a extravasarse a la membrana sinovial inflamada de pacientes con RA, lo que implicaría que estos monocitos serían menos proinflamatorios y contribuirían a la resolución de la sinovitis. Para poder obtener resultados concluyentes, actualmente continuamos con el reclutamiento de pacientes con RA en tratamiento con JAKi (tofacitinib, baricitinib, upadacitinib, filgotinib y peficitinib). En base a los primeros resultados, este estudio observacional ha mostrado ser muy prometedor y, además, remarca de nuevo la capacidad reprogramadora del upadacitinib y sus beneficios terapéuticos.

La seguridad y eficacia de los JAKi ha sido probada en numerosos ensayos clínicos en pacientes con RA ^{256,325}, si bien se han publicado algunos efectos adversos, entre los que destaca el aumento de infecciones por virus, como el herpes zoster ^{244,326}. Estas posibles infecciones están siendo prevenidas al comienzo del tratamiento con los JAKi empleando

vacunas. Un estudio en linfocitos T CD4⁺ de pacientes con RA tratados con tofacitinib ³²⁷, mostró una menor activación, proliferación y producción de IFN- γ en respuesta a una infección por el virus Herpes Zoster, lo que correlaciona con el aumento de infecciones por este virus observado en los diferentes ensayos clínicos con tofacitinib ^{257,262}. Aún no se han obtenido datos sobre el efecto de los JAKi en la respuesta antiviral mediada por monocitos o macrófagos en pacientes con RA. Sin embargo, los resultados de esta tesis muestran un aumento de MAFB en los UPA-GM-M \emptyset , y se ha publicado que MAFB actúa como antagonista de la respuesta a interferón de tipo I a través del bloqueo del reclutamiento de coactivadores del factor de transcripción IRF3 ³²⁸, un inductor positivo de la respuesta antiviral. La unión de MAFB a IRF3 impide su unión a las regiones promotoras de sus genes diana, como *IFNB1*, impidiendo su transcripción. El papel fisiológico de MAFB como reóstato a través de su unión a IRF3 permite controlar una respuesta excesiva ante infecciones por virus y la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinflamatorias ³²⁹. Por tanto, el aumento de expresión de MAFB *in vivo* no solo podría estar implicado en la diferenciación de monocitos a macrófagos de perfil antiinflamatorio, sino también en el aumento de las infecciones en los pacientes tratados con JAKi. Nuestros resultados *in vitro* muestran un aumento de MAFB desde el punto de vista génico y proteico tras el tratamiento con JAKi, y solo uno de los pacientes reclutados en el estudio muestra un aumento significativo en la expresión de *MAFB* tras tres meses de tratamiento con upadacitinib, por lo que el aumento en el tamaño muestral es necesario para esclarecer la relación entre MAFB y los efectos adversos de los JAKi en los pacientes.

En este trabajo se han empleado HD-MTX como tratamiento para simular las condiciones de uso frente a tumores hematológicos, y hemos demostrado su papel como agente reprogramador de macrófagos antiinflamatorios (M-M \emptyset) hacia un perfil proinflamatorio y antitumoral (similar a GM-M \emptyset). Sin embargo, el MTX también es un fármaco empleado a bajas dosis en RA como tratamiento de primera línea. Previamente en nuestro laboratorio, hemos abordado los efectos inducidos por LD-MTX en GM-M \emptyset para identificar a los agentes y mecanismos implicados en sus efectos antiinflamatorios en los pacientes con RA ^{28,31,40,53,275,276}. Así, hemos aumentado el conocimiento sobre los efectos reprogramadores del MTX a diferentes concentraciones y en diferentes tipos de macrófago. La estrategia de reprogramación de macrófagos en RA sigue siendo explorada en profundidad actualmente. Al efecto inductor de tolerancia y reprogramador del MTX sobre los macrófagos de perfil patogénico en RA propuesto por nuestro grupo, sumamos ahora el efecto reprogramador de los JAKi, aportando nuevos mecanismos que podrían ser utilizados como diana terapéutica, como es la señalización JAK/STAT o el eje GSK3/MAFB.

CONCLUSIONES

De las publicaciones presentadas se extraen las siguientes conclusiones:

1. El tratamiento con dosis altas de MTX (HD-MTX) altera el perfil transcripcional de los macrófagos derivados de monocitos en presencia de M-CSF (M-MØ), promoviendo la adquisición de genes característicos de macrófagos proinflamatorios, y de la firma genética de macrófagos antitumorales (TAMs “pequeños”).
2. El cambio inducido por HD-MTX en el perfil transcripcional de los M-MØ correlaciona con una reducción de la expresión y actividad del receptor de M-CSF (CSF1R), y con una disminución en la expresión de los factores de transcripción MAF y MAFB, cuya actividad depende de GSK3.
3. La capacidad reprogramadora de HD-MTX sobre macrófagos humanos hacia un fenotipo antitumoral se puede prevenir mediante la inhibición de GSK3.
4. El tratamiento con el inhibidor de JAK (JAKi) upadacitinib restablece el balance de las subpoblaciones de monocitos de pacientes con artritis reumatoide (RA) a proporciones similares a las encontradas en individuos sanos, y modifica el perfil transcriptómico de monocitos CD14⁺. Este efecto correlaciona con la disminución en el índice de actividad de la enfermedad DAS28.
5. El empleo de upadacitinib sesga a los macrófagos derivados de monocitos en presencia de GM-CSF (GM-MØ) hacia la adquisición de un perfil transcripcional antiinflamatorio de manera dosis-dependiente. Además, exhiben un enriquecimiento positivo en los genes que definen a los macrófagos sinoviales asociados con la resolución de la inflamación.
6. Upadacitinib aumenta significativamente la expresión de MAFB, de genes regulados por MAFB y de la fosforilación inhibidora de GSK3 β en los GM-MØ.
7. Desde el punto de vista funcional, upadacitinib promueve un aumento de la actividad fagocítica y eferocítica de los GM-MØ. Además, upadacitinib disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias y aumenta la concentración de IL-10 en respuesta a LPS.
8. Los fármacos HD-MTX y JAKi son capaces de reprogramar a macrófagos derivados de monocitos humanos, alterando su perfil transcripcional, bioquímico y funcional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Williams, H. *et al.* Monocyte Differentiation and Heterogeneity: Inter-Subset and Interindividual Differences. *Int J Mol Sci* **24**, 8757 (2023).
2. Ziegler-Heitbrock, H. W. L. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* **67**, 603–606 (2000).
3. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**, 953–964 (2005).
4. Tacke, F. & Randolph, G. J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* **211**, 609–618 (2006).
5. Passlick, B., Flieger, D. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**, 2527–34 (1989).
6. Wong, K. L. *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* **118**, e16–e31 (2011).
7. Dutertre, C.-A. *et al.* Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity* **51**, 573–589.e8 (2019).
8. Patel, A. A. *et al.* The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **214**, 1913–1923 (2017).
9. Tak, T. *et al.* Circulatory and maturation kinetics of human monocyte subsets in vivo. *Blood* **130**, 1474–1477 (2017).
10. Liao, C.-T. *et al.* Peritoneal macrophage heterogeneity is associated with different peritoneal dialysis outcomes. *Kidney Int* **91**, 1088–1103 (2017).
11. Zigmond, E. *et al.* Infiltrating Monocyte-Derived Macrophages and Resident Kupffer Cells Display Different Ontogeny and Functions in Acute Liver Injury. *The Journal of Immunology* **193**, 344–353 (2014).
12. Arnold, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* **204**, 1057–1069 (2007).
13. Bain, C. C. *et al.* Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol* **15**, 929–937 (2014).
14. Guilliams, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* **14**, 571–578 (2014).
15. Cros, J. *et al.* Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* **33**, 375–386 (2010).
16. Auffray, C. *et al.* Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science (1979)* **317**, 666–670 (2007).
17. Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A. & Merad, M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* **15**, 731–744 (2015).
18. Italiani, P. & Boraschi, D. New Insights Into Tissue Macrophages: From Their Origin to the Development of Memory. *Immune Netw* **15**, 167 (2015).

BIBLIOGRAFÍA

19. Hoeffel, G. & Ginhoux, F. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell Immunol* **330**, 5–15 (2018).
20. Beutler, B. Innate immunity: An overview. *Mol Immunol* **40**, 845–859 (2004).
21. Blériot, C., Chakarov, S. & Ginhoux, F. Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity* vol. 52 957–970 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.014> (2020).
22. Ginhoux, F. & Williams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**, 439–449 (2016).
23. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**, 889–896 (2010).
24. Anthony, R. M. *et al.* Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med* **12**, 955–960 (2006).
25. Pesce, J. T. *et al.* Arginase-1-Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine-Driven Inflammation and Fibrosis. *PLoS Pathog* **5**, e1000371 (2009).
26. Li, G., Hao, W. & Hu, W. Transcription factor PU.1 and immune cell differentiation (Review). *Int J Mol Med* **46**, 1943–1950 (2020).
27. Mueller, B. U. *et al.* Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* **100**, 998–1007 (2002).
28. Sierra-Filardi, E. *et al.* Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* **117**, 5092–5101 (2011).
29. Puig-Kröger, A. *et al.* Folate Receptor β Is Expressed by Tumor-Associated Macrophages and Constitutes a Marker for M2 Anti-inflammatory/Regulatory Macrophages. *Cancer Res* **69**, 9395–9403 (2009).
30. Domínguez-Soto, A. *et al.* Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin Expression on M2-Polarized and Tumor-Associated Macrophages Is Macrophage-CSF Dependent and Enhanced by Tumor-Derived IL-6 and IL-10. *The Journal of Immunology* **186**, 2192–2200 (2011).
31. Municio, C. *et al.* Methotrexate limits inflammation through an A20-dependent cross-tolerance mechanism. *Ann Rheum Dis* **77**, 752–759 (2018).
32. Rodriguez, R. M. *et al.* Signal Integration and Transcriptional Regulation of the Inflammatory Response Mediated by the GM-/M-CSF Signaling Axis in Human Monocytes. *Cell Rep* **29**, 860-872.e5 (2019).
33. Yi, M. *et al.* Exploiting innate immunity for cancer immunotherapy. *Molecular Cancer* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01885-w> (2023).
34. Rana, A. K., Li, Y., Dang, Q. & Yang, F. Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *International Immunopharmacology* vol. 65 348–359 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.10.016> (2018).

35. Lee, K. M., Achuthan, A. A. & Hamilton, J. A. GM-CSF: A Promising Target in Inflammation and Autoimmunity. *Immunotargets Ther* **Volume 9**, 225–240 (2020).
36. Hamilton, J. A. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol* **23**, 403–408 (2002).
37. Gasson, J. C. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **77**, 1131–45 (1991).
38. Ushach, I. & Zlotnik, A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol* **100**, 481–489 (2016).
39. Hamilton, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 533–544 (2008).
40. Palacios, B. S. *et al.* Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin a-dependent pro-inflammatory profile. *Journal of Pathology* **235**, 515–526 (2015).
41. Dong, F. & He, X. Activin A: A Potential Therapeutic Target for Characterizing and Stopping Joint Pain Early in Rheumatoid Arthritis Patients. *Inflammation* **37**, 170–176 (2014).
42. Hamilton, J. A. GM-CSF in inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **217**, (2020).
43. Hamilton, J. A. GM-CSF-Dependent Inflammatory Pathways. *Front Immunol* **10**, (2019).
44. Lawrence, T. & Natoli, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* **11**, 750–761 (2011).
45. Ohmori, Y. & Hamilton, T. A. IL-4-induced STAT6 suppresses IFN-gamma-stimulated STAT1-dependent transcription in mouse macrophages. *J Immunol* **159**, 5474–82 (1997).
46. Lehtonen, A., Matikainen, S., Miettinen, M. & Julkunen, I. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* **71**, 511–519 (2002).
47. Juhas, U., Ryba-Stanisławowska, M., Szargiej, P. & Myśliwska, J. Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postepy Hig Med Dosw* **69**, 496–502 (2015).
48. Savitsky, D., Tamura, T., Yanai, H. & Taniguchi, T. Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **59**, 489–510 (2010).
49. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared Principles in NF-κB Signaling. *Cell* **132**, 344–362 (2008).
50. Escribese, M. M. *et al.* The Prolyl Hydroxylase PHD3 Identifies Proinflammatory Macrophages and Its Expression Is Regulated by Activin A. *The Journal of Immunology* **189**, 1946–1954 (2012).
51. Lacey, D. C. *et al.* Defining GM-CSF– and Macrophage-CSF–Dependent Macrophage Responses by In Vitro Models. *The Journal of Immunology* **188**, 5752–5765 (2012).

52. Shapouri-Moghaddam, A. *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology* vol. 233 6425–6440 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jcp.26429> (2018).
53. Samaniego, R. *et al.* Macrophage uptake and accumulation of folates are polarization-dependent in vitro and in vivo and are regulated by activin A. *J Leukoc Biol* **95**, 797–808 (2014).
54. Fleetwood, A. J., Lawrence, T., Hamilton, J. A. & Cook, A. D. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-Dependent Macrophage Phenotypes Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation. *The Journal of Immunology* **178**, 5245–5252 (2007).
55. Hamilton, J. A., Cook, A. D. & Tak, P. P. Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 16 53–70 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.231> (2016).
56. Sierra-Filardi, E. *et al.* CCL2 Shapes Macrophage Polarization by GM-CSF and M-CSF: Identification of CCL2/CCR2-Dependent Gene Expression Profile. *The Journal of Immunology* **192**, 3858–3867 (2014).
57. Wynn, T. A. & Vannella, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* **44**, 450–462 (2016).
58. Krausgruber, T. *et al.* IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* **12**, 231–238 (2011).
59. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958–969 (2008).
60. Smith, A. M. *et al.* Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 1883–1897 (2009).
61. Woollard, K. J. & Geissmann, F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* **7**, 77–86 (2010).
62. Van Overmeire, E. *et al.* M-CSF and GM-CSF Receptor Signaling Differentially Regulate Monocyte Maturation and Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* **76**, 35–42 (2016).
63. Stanley, E. R. & Chitu, V. CSF-1 receptor signaling in myeloid cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021857> (2014).
64. Pixley, F. J. & Stanley, E. R. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* **14**, 628–638 (2004).
65. Li, M. *et al.* Signaling pathways in macrophages: molecular mechanisms and therapeutic targets. *MedComm* vol. 4 Preprint at <https://doi.org/10.1002/mco2.349> (2023).

66. Hume, D. A. & MacDonald, K. P. A. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* **119**, 1810–1820 (2012).
67. de las Casas-Engel, M. *et al.* Serotonin Skews Human Macrophage Polarization through HTR2B and HTR7. *The Journal of Immunology* **190**, 2301–2310 (2013).
68. Cuevas, V. D. *et al.* MAFB Determines Human Macrophage Anti-Inflammatory Polarization: Relevance for the Pathogenic Mechanisms Operating in Multicentric Carpootarsal Osteolysis. *The Journal of Immunology* **198**, 2070–2081 (2017).
69. Sierra-Filardi, E., Vega, M. A., Sánchez-Mateos, P., Corbí, A. L. & Puig-Kröger, A. Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. *Immunobiology* **215**, 788–795 (2010).
70. Simón-Fuentes, M. *et al.* MAFB shapes human monocyte-derived macrophage response to SARS-CoV-2 and controls severe COVID-19 biomarker expression. *JCI Insight* **8**, (2023).
71. Dall, E. & Brandstetter, H. Structure and function of legumain in health and disease. *Biochimie* **122**, 126–150 (2016).
72. Verreck, F. A. W. *et al.* Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 4560–4565 (2004).
73. Daassi, D. *et al.* Differential expression patterns of MafB and c-Maf in macrophages in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **473**, 118–124 (2016).
74. Kim, H. The transcription factor MafB promotes anti-inflammatory M2 polarization and cholesterol efflux in macrophages. *Sci Rep* **7**, 7591 (2017).
75. Kang, K. *et al.* Interferon- γ Represses M2 Gene Expression in Human Macrophages by Disassembling Enhancers Bound by the Transcription Factor MAF. *Immunity* **47**, 235–250.e4 (2017).
76. Shaulian, E. & Karin, M. *AP-1 as a Regulator of Cell Life and Death*. *NATURE CELL BIOLOGY* vol. 4 <http://cellbio.nature.com/E131> (2002).
77. Eychène, A., Rocques, N. & Pouponnot, C. A new MAFia in cancer. *Nature Reviews Cancer* vol. 8 683–693 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrc2460> (2008).
78. Rocques, N. *et al.* GSK-3-Mediated Phosphorylation Enhances Maf-Transforming Activity. *Mol Cell* **28**, 584–597 (2007).
79. Beurel, E., Grieco, S. F. & Jope, R. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther* **148**, 114–131 (2015).
80. Yuan, J. & Ofengeim, D. A guide to cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00689-6> (2023).
81. Hadis, U. *et al.* Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3+ Regulatory T Cells in the Lamina Propria. *Immunity* **34**, 237–246 (2011).
82. Burgess, A. W. & Metcalf, D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* **56**, 947–58 (1980).

83. Hamilton, J. A., Stanley, E. R., Burgess, A. W. & Shadduck, R. K. Stimulation of macrophage plasminogen activator activity by colony-stimulating factors. *J Cell Physiol* **103**, 435–445 (1980).
84. Hamilton, J. A. & Achuthan, A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends Immunol* **34**, 81–89 (2013).
85. Dougan, M., Dranoff, G. & Dougan, S. K. GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation. *Immunity* **50**, 796–811 (2019).
86. Achuthan, A. A., Lee, K. M. C. & Hamilton, J. A. Targeting GM-CSF in inflammatory and autoimmune disorders. *Seminars in Immunology* vol. 54 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101523> (2021).
87. van de Laar, L., Coffey, P. J. & Woltman, A. M. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* **119**, 3383–3393 (2012).
88. Zhan, Y., Lew, A. M. & Chopin, M. The Pleiotropic Effects of the GM-CSF Rheostat on Myeloid Cell Differentiation and Function: More Than a Numbers Game. *Frontiers in Immunology* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02679> (2019).
89. Adachi, T., Pazdrak, K., Stafford, S. & Alam, R. The Mapping of the Lyn Kinase Binding Site of the Common β Subunit of IL-3/Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor/IL-5 Receptor. *The Journal of Immunology* **162**, 1496–1501 (1999).
90. Dahl, M. E., Arai, K. & Watanabe, S. Association of Lyn tyrosine kinase to the GM-CSF and IL-3 receptor common β c subunit and role of Src tyrosine kinases in DNA synthesis and anti-apoptosis. *Genes to Cells* **5**, 143–153 (2000).
91. Bunda, S., Kommaraju, K., Heir, P. & Ohh, M. SOCS-1 Mediates Ubiquitylation and Degradation of GM-CSF Receptor. *PLoS One* **8**, e76370 (2013).
92. Stanley, E. R. & Heard, P. M. Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J Biol Chem* **252**, 4305–12 (1977).
93. Stanley, E. R., Chen, D.-M. & Lin, H.-S. Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. *Nature* **274**, 168–170 (1978).
94. Yeung, Y. G., Jubinsky, P. T., Sengupta, A., Yeung, D. C. & Stanley, E. R. Purification of the colony-stimulating factor 1 receptor and demonstration of its tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 1268–1271 (1987).
95. Coussens, L. *et al.* Structural alteration of viral homologue of receptor proto-oncogene fms at carboxyl terminus. *Nature* **320**, 277–280 (1986).
96. Rothwell, V. M. & Rohrschneider, L. R. Murine c-fms cDNA: cloning, sequence analysis and retroviral expression. *Oncogene Res* **1**, 311–24 (1987).
97. Hampe, A., Shamoon, B. M., Gobet, M., Sherr, C. J. & Galibert, F. Nucleotide sequence and structural organization of the human FMS proto-oncogene. *Oncogene Res* **4**, 9–17 (1989).

98. Sarrazin, S. *et al.* MafB Restricts M-CSF-Dependent Myeloid Commitment Divisions of Hematopoietic Stem Cells. *Cell* **138**, 300–313 (2009).
99. Guilbert, L. J. & Stanley, E. R. Specific interaction of murine colony-stimulating factor with mononuclear phagocytic cells. *J Cell Biol* **85**, 153–159 (1980).
100. MacDonald, K. P. A. *et al.* The Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Is Expressed on Dendritic Cells during Differentiation and Regulates Their Expansion. *The Journal of Immunology* **175**, 1399–1405 (2005).
101. Nandi, S. *et al.* The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Dev Biol* **367**, 100–113 (2012).
102. Huynh, D. *et al.* Colony Stimulating Factor-1 Dependence of Paneth Cell Development in the Mouse Small Intestine. *Gastroenterology* **137**, 136-144.e3 (2009).
103. Luo, J. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) signaling in injured neurons facilitates protection and survival. *Journal of Experimental Medicine* **210**, 157–172 (2013).
104. Chitu, V., Stanley, E. R. & Yarden, Y. *The Receptor Tyrosine Kinase Handbook*. (2014).
105. Lin, H. *et al.* Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome. *Science* (1979) **320**, 807–811 (2008).
106. Mouchemore, K. A. & Pixley, F. J. CSF-1 signaling in macrophages: pleiotrophy through phosphotyrosine-based signaling pathways. *Crit Rev Clin Lab Sci* **49**, 49–61 (2012).
107. Muñoz-García, J. *et al.* The twin cytokines interleukin-34 and CSF-1: masterful conductors of macrophage homeostasis. *Theranostics* **11**, 1568–1593 (2021).
108. Xiang, C., Li, H. & Tang, W. Targeting CSF-1R represents an effective strategy in modulating inflammatory diseases. *Pharmacol Res* **187**, 106566 (2023).
109. Arranz, A. *et al.* Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 9517–9522 (2012).
110. Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 392–401 (2006).
111. Hale, M. D., Hayden, J. D. & Grabsch, H. I. Tumour-microenvironment interactions: role of tumour stroma and proteins produced by cancer-associated fibroblasts in chemotherapy response. *Cellular Oncology* **36**, 95–112 (2013).
112. Cassetta, L. *et al.* Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming, Biomarkers, and Therapeutic Targets. *Cancer Cell* **35**, 588-602.e10 (2019).
113. Mantovani, A., Allavena, P., Marchesi, F. & Garlanda, C. Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 21 799–820 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00520-5> (2022).

114. Belgiovine, C., Digifico, E., Anfray, C., Ummarino, A. & Andón, F. T. Targeting tumor-associated macrophages in anti-cancer therapies: Convincing the traitors to do the right thing. *Journal of Clinical Medicine* vol. 9 1–24 Preprint at <https://doi.org/10.3390/jcm9103226> (2020).
115. Ruffell, B. & Coussens, L. M. Macrophages and Therapeutic Resistance in Cancer. *Cancer Cell* **27**, 462–472 (2015).
116. Bart, V. M. T., Pickering, R. J., Taylor, P. R. & Ipseiz, N. Macrophage reprogramming for therapy. *Immunology* **163**, 128–144 (2021).
117. Schultze, J. L. Reprogramming of macrophages — new opportunities for therapeutic targeting. *Curr Opin Pharmacol* **26**, 10–15 (2016).
118. Toledo, B. *et al.* Deciphering the performance of macrophages in tumour microenvironment: a call for precision immunotherapy. *J Hematol Oncol* **17**, 44 (2024).
119. Gomez-Brouchet, A. *et al.* CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients: An immunohistochemical analysis of the biopsies from the French OS2006 phase 3 trial. *Oncoimmunology* **6**, e1331193 (2017).
120. Kovaleva, O. V. *et al.* Immunosuppressive Phenotype of Esophagus Tumors Stroma. *Analytical Cellular Pathology* **2020**, 1–9 (2020).
121. Donadon, M. *et al.* Macrophage morphology correlates with single-cell diversity and prognosis in colorectal liver metastasis. *Journal of Experimental Medicine* **217**, (2020).
122. Ma, R.-Y., Black, A. & Qian, B.-Z. Macrophage diversity in cancer revisited in the era of single-cell omics. *Trends Immunol* **43**, 546–563 (2022).
123. Bied, M., Ho, W. W., Ginhoux, F. & Blériot, C. Roles of macrophages in tumor development: a spatiotemporal perspective. *Cellular and Molecular Immunology* vol. 20 983–992 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01061-6> (2023).
124. Hwang, I. *et al.* Tumor-associated macrophage, angiogenesis and lymphangiogenesis markers predict prognosis of non-small cell lung cancer patients. *J Transl Med* **18**, 443 (2020).
125. Chen, P. *et al.* Tumor-Associated Macrophages Promote Angiogenesis and Melanoma Growth via Adrenomedullin in a Paracrine and Autocrine Manner. *Clinical Cancer Research* **17**, 7230–7239 (2011).
126. Radharani, N. N. V. *et al.* Tumor-associated macrophage derived IL-6 enriches cancer stem cell population and promotes breast tumor progression via Stat-3 pathway. *Cancer Cell Int* **22**, 122 (2022).
127. Arima, K. *et al.* Downregulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase by interleukin-1 β from activated macrophages leads to poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci* **109**, 462–470 (2018).
128. Wu, Y. & Zhou, B. P. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* **102**, 639–644 (2010).

129. Ramachandran, A. *et al.* TGF- β uses a novel mode of receptor activation to phosphorylate SMAD1/5 and induce epithelial-to-mesenchymal transition. *Elife* **7**, (2018).
130. Bonde, A.-K., Tischler, V., Kumar, S., Soltermann, A. & Schwendener, R. A. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer* **12**, 35 (2012).
131. Bahr, J. C., Li, X.-Y., Feinberg, T. Y., Jiang, L. & Weiss, S. J. Divergent regulation of basement membrane trafficking by human macrophages and cancer cells. *Nat Commun* **13**, 6409 (2022).
132. Sangaletti, S. *et al.* Macrophage-Derived SPARC Bridges Tumor Cell-Extracellular Matrix Interactions toward Metastasis. *Cancer Res* **68**, 9050–9059 (2008).
133. Madsen, D. H. *et al.* Tumor-Associated Macrophages Derived from Circulating Inflammatory Monocytes Degrade Collagen through Cellular Uptake. *Cell Rep* **21**, 3662–3671 (2017).
134. Borriello, L. *et al.* Primary tumor associated macrophages activate programs of invasion and dormancy in disseminating tumor cells. *Nat Commun* **13**, 626 (2022).
135. Oishi, Y. & Manabe, I. Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. *NPJ Aging Mech Dis* **2**, 16018 (2016).
136. Grossman, J. G. *et al.* Recruitment of CCR2+ tumor associated macrophage to sites of liver metastasis confers a poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* **7**, e1470729 (2018).
137. Qian, B.-Z. *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **475**, 222–225 (2011).
138. Cassetta, L. & Pollard, J. W. A timeline of tumour-associated macrophage biology. *Nat Rev Cancer* **23**, 238–257 (2023).
139. Ducker, G. S. & Rabinowitz, J. D. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab* **25**, 27–42 (2017).
140. Gonen, N. & Assaraf, Y. G. Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resistance Updates* **15**, 183–210 (2012).
141. Zarou, M. M., Vazquez, A. & Vignir Helgason, G. Folate metabolism: a re-emerging therapeutic target in haematological cancers. *Leukemia* **35**, 1539–1551 (2021).
142. Chabner, B. A. & Roberts, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* **5**, 65–72 (2005).
143. Lin, J. T. *et al.* Basis for natural resistance to methotrexate in human acute non-lymphocytic leukemia. *Leuk Res* **15**, 1191–1196 (1991).
144. Takami, M., Kuniyoshi, Y., Oomukai, T., Ishida, T. & Yamano, Y. Severe Complications After High-Dose Methotrexate Treatment. *Acta Oncol (Madr)* **34**, 611–612 (1995).
145. Hoekstra, M. Factors associated with toxicity, final dose, and efficacy of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **62**, 423–426 (2003).

146. Assaraf, Y. G. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer and Metastasis Reviews* **26**, 153–181 (2007).
147. Rossi, G. *et al.* The evolving role of pemetrexed disodium for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother* **19**, 1969–1976 (2018).
148. Taylor, Peter. C. *et al.* How to Get the Most from Methotrexate (MTX) Treatment for Your Rheumatoid Arthritis Patient?—MTX in the Treat-to-Target Strategy. *J Clin Med* **8**, 515 (2019).
149. Brown, P. M., Pratt, A. G. & Isaacs, J. D. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nat Rev Rheumatol* **12**, 731–742 (2016).
150. Kool, M. *et al.* MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 6914–6919 (1999).
151. Joerger, M., Omlin, A., Cerny, T. & Fruh, M. The Role of Pemetrexed in Advanced Non Small-Cell Lung Cancer: Special Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. *Curr Drug Targets* **11**, 37–47 (2010).
152. Shih, C. *et al.* LY231514, a pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-based antifolate that inhibits multiple folate-requiring enzymes. *Cancer Res* **57**, 1116–23 (1997).
153. Lustgarten, D. E. S. *et al.* Thymidylate Synthase and Folyl-Polyglutamate Synthase Are Not Clinically Useful Markers of Response to Pemetrexed in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma. *Journal of Thoracic Oncology* **8**, 469–477 (2013).
154. de Jonge-Peeters, S. D. P. W. M., Kuipers, F., de Vries, E. G. E. & Vellenga, E. ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance. *Crit Rev Oncol Hematol* **62**, 214–226 (2007).
155. Rots, M. G. *et al.* Role of folylpolyglutamate synthetase and folylpolyglutamate hydrolase in methotrexate accumulation and polyglutamylation in childhood leukemia. *Blood* **93**, 1677–83 (1999).
156. Puig, L. *et al.* La prevalencia de diez enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMID) en España. *Rev Esp Salud Publica* **93**, (2019).
157. McInnes, I. B. & Gravallese, E. M. Immune-mediated inflammatory disease therapeutics: past, present and future. *Nature Reviews Immunology* vol. 21 680–686 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00603-1> (2021).
158. El-Gabalawy, H., Guenther, L. C. & Bernstein, C. N. Epidemiology of Immune-Mediated Inflammatory Diseases: Incidence, Prevalence, Natural History, and Comorbidities. *J Rheumatol Suppl* **85**, 2–10 (2010).
159. Andrade, P., A Sacristan, J., Luz Rentero, M., Hammen, V. & Dilla, T. The Burden of Rheumatoid Arthritis in Spain. *Health Econ Outcome Res* **03**, (2017).
160. Gravallese, E. M. & Firestein, G. S. Rheumatoid Arthritis — Common Origins, Divergent Mechanisms. *New England Journal of Medicine* **388**, 529–542 (2023).
161. Di Matteo, A., Bathon, J. M. & Emery, P. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* **402**, 2019–2033 (2023).

162. McInnes, I. B. & Schett, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet* **389**, 2328–2337 (2017).
163. Ea, H.-K., Bazille, C. & Lioté, F. Histologie et physiologie de la membrane synoviale. *EMC - Appareil locomoteur* **3**, 1–6 (2008).
164. McInnes, I. B. & Schett, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* **365**, 2205–2219 (2011).
165. Alivernini, S. *et al.* Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis. *Nat Med* **26**, 1295–1306 (2020).
166. Hemminki, K., Li, X., Sundquist, J. & Sundquist, K. Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. *Arthritis Rheum* **60**, 661–668 (2009).
167. Firestein, G. S. & McInnes, I. B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity* **46**, 183–196 (2017).
168. Ben Mrid, R. *et al.* Anti-rheumatoid drugs advancements: New insights into the molecular treatment of rheumatoid arthritis. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 151 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113126> (2022).
169. Kurowska, W., Kuca-Warnawin, E. H., Radzikowska, A. & Maśliński, W. The role of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Central European Journal of Immunology* **42**, 390–398 (2017).
170. Bas, S. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, IgM and IgA rheumatoid factors in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **42**, 677–680 (2003).
171. Saevarsdottir, S. *et al.* Multiomics analysis of rheumatoid arthritis yields sequence variants that have large effects on risk of the seropositive subset. *Ann Rheum Dis* **81**, 1085–1095 (2022).
172. Malmström, V., Catrina, A. I. & Klareskog, L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat Rev Immunol* **17**, 60–75 (2017).
173. Myasoedova, E., Davis, J., Matteson, E. L. & Crowson, C. S. Is the epidemiology of rheumatoid arthritis changing? Results from a population-based incidence study, 1985–2014. *Ann Rheum Dis* **79**, 440–444 (2020).
174. Li, K., Wang, M., Zhao, L., Liu, Y. & Zhang, X. ACPA-negative rheumatoid arthritis: From immune mechanisms to clinical translation. *EBioMedicine* **83**, 104233 (2022).
175. Kumar, L. D., Karthik, R., Gayathri, N. & Sivasudha, T. Advancement in contemporary diagnostic and therapeutic approaches for rheumatoid arthritis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **79**, 52–61 (2016).
176. Paleolog, E. M. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **4**, S81 (2002).
177. Choy, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **51**, v3–v11 (2012).
178. Haringman, J. J. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **64**, 834–838 (2005).

179. Alivernini, S. *et al.* Tapering and discontinuation of TNF- α blockers without disease relapse using ultrasonography as a tool to identify patients with rheumatoid arthritis in clinical and histological remission. *Arthritis Res Ther* **18**, 39 (2016).
180. Ajeganova, S. & Huizinga, T. Sustained remission in rheumatoid arthritis: latest evidence and clinical considerations. *Ther Adv Musculoskelet Dis* **9**, 249–262 (2017).
181. Heimans, L. *et al.* Two-year results of disease activity score (DAS)-remission-steered treatment strategies aiming at drug-free remission in early arthritis patients (the IMPROVED-study). *Arthritis Res Ther* **18**, 23 (2016).
182. Haschka, J. *et al.* Relapse rates in patients with rheumatoid arthritis in stable remission tapering or stopping antirheumatic therapy: interim results from the prospective randomised controlled RETRO study. *Ann Rheum Dis* **75**, 45–51 (2016).
183. Rech, J. *et al.* Prediction of disease relapses by multibiomarker disease activity and autoantibody status in patients with rheumatoid arthritis on tapering DMARD treatment. *Ann Rheum Dis* **75**, 1637–1644 (2016).
184. Boeters, D. M., Burgers, L. E., Toes, R. E. & van der Helm-van Mil, A. Does immunological remission, defined as disappearance of autoantibodies, occur with current treatment strategies? A long-term follow-up study in rheumatoid arthritis patients who achieved sustained DMARD-free status. *Ann Rheum Dis* **78**, 1497–1504 (2019).
185. Misharin, A. V. *et al.* Nonclassical Ly6C⁺ Monocytes Drive the Development of Inflammatory Arthritis in Mice. *Cell Rep* **9**, 591–604 (2014).
186. Culemann, S. *et al.* Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. *Nature* **572**, 670–675 (2019).
187. Zhang, F. *et al.* Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol* **20**, 928–942 (2019).
188. Edalat, S. G. *et al.* Molecular maps of synovial cells in inflammatory arthritis using an optimized synovial tissue dissociation protocol. *iScience* **27**, 109707 (2024).
189. Kurowska-Stolarska, M. & Alivernini, S. Synovial tissue macrophages in joint homeostasis, rheumatoid arthritis and disease remission. *Nat Rev Rheumatol* **18**, 384–397 (2022).
190. Kahles, F., Findeisen, H. M. & Bruemmer, D. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab* **3**, 384–393 (2014).
191. MacDonald, L. *et al.* COVID-19 and RA share an SPP1 myeloid pathway that drives PD-L1⁺ neutrophils and CD14⁺ monocytes. *JCI Insight* **6**, (2021).
192. Cooles, F. A. H. *et al.* The interferon gene signature is increased in patients with early treatment-naïve rheumatoid arthritis and predicts a poorer response to initial therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **141**, 445-448.e4 (2018).
193. Lettre, G. & Rioux, J. D. Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies. *Hum Mol Genet* **17**, R116–R121 (2008).

194. Kuhn, A., Wenzel, J. & Weyd, H. Photosensitivity, Apoptosis, and Cytokines in the Pathogenesis of Lupus Erythematosus: a Critical Review. *Clin Rev Allergy Immunol* **47**, 148–162 (2014).
195. Wicks, I. P. & Roberts, A. W. Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* **12**, 37–48 (2016).
196. Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X. & Wang, W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1> (2021).
197. Owen, K. L., Brockwell, N. K. & Parker, B. S. JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers (Basel)* **11**, 2002 (2019).
198. Fu, X.-Y. A direct signaling pathway through tyrosine kinase activation of SH2 domain-containing transcription factors. *J Leukoc Biol* **57**, 529–535 (1995).
199. Zhong, Z., Wen, Z. & Darnell, J. E. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 4806–4810 (1994).
200. Liu, X., Robinson, G. W., Gouilleux, F., Groner, B. & Hennighausen, L. Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 8831–8835 (1995).
201. Wilks, A. F. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 1603–1607 (1989).
202. Wilks, A. F. *et al.* Two Novel Protein-Tyrosine Kinases, Each with a Second Phosphotransferase-Related Catalytic Domain, Define a New Class of Protein Kinase. *Mol Cell Biol* **11**, 2057–2065 (1991).
203. Krolewski, J. J., Lee, R., Eddy, R., Shows, T. B. & Dalla-Favera, R. Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene* **5**, 277–82 (1990).
204. Velazquez, L., Fellous, M., Stark, G. R. & Pellegrini, S. A protein tyrosine kinase in the interferon $\alpha\beta$ signaling pathway. *Cell* **70**, 313–322 (1992).
205. Müller, M. *et al.* The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon- α/β and γ signal transduction. *Nature* **366**, 129–135 (1993).
206. Lai, K. S. *et al.* A Kinase-deficient Splice Variant of the Human JAK3 Is Expressed in Hematopoietic and Epithelial Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 25028–25036 (1995).
207. Verbsky, J. W. *et al.* Expression of Janus Kinase 3 in Human Endothelial and Other Non-lymphoid and Non-myeloid Cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 13976–13980 (1996).
208. Gurniak, C. B. & Berg, L. J. Murine JAK3 is preferentially expressed in hematopoietic tissues and lymphocyte precursor cells. *Blood* **87**, 3151–60 (1996).

209. Harpur, A. G., Andres, A. C., Ziemiecki, A., Aston, R. R. & Wilks, A. F. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* **7**, 1347–53 (1992).
210. Ferrao, R. & Lupardus, P. J. The Janus Kinase (JAK) FERM and SH2 Domains: Bringing Specificity to JAK–Receptor Interactions. *Front Endocrinol (Lausanne)* **8**, (2017).
211. Garrido-Trigo, A. & Salas, A. Molecular Structure and Function of Janus Kinases: Implications for the Development of Inhibitors. *J Crohns Colitis* **14**, S713–S724 (2020).
212. Schindler, C. & Strehlow, I. Cytokines and STAT Signaling. in 113–174 (1999). doi:10.1016/S1054-3589(08)60111-8.
213. Krause, C. D. *et al.* Interactions among the components of the interleukin-10 receptor complex. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 377–385 (2006).
214. Naismith, J. H., Devine, T. Q., Brandhuber, B. J. & Sprang, S. R. Crystallographic Evidence for Dimerization of Unliganded Tumor Necrosis Factor Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 13303–13307 (1995).
215. Livnah, O. *et al.* Crystallographic Evidence for Preformed Dimers of Erythropoietin Receptor Before Ligand Activation. *Science (1979)* **283**, 987–990 (1999).
216. Remy, I., Wilson, I. A. & Michnick, S. W. Erythropoietin Receptor Activation by a Ligand-Induced Conformation Change. *Science (1979)* **283**, 990–993 (1999).
217. O’Shea, J. J. *et al.* The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. *Annu Rev Med* **66**, 311–328 (2015).
218. Durham, G. A., Williams, J. J. L., Nasim, M. T. & Palmer, T. M. Targeting SOCS Proteins to Control JAK-STAT Signalling in Disease. *Trends Pharmacol Sci* **40**, 298–308 (2019).
219. Bharadwaj, U., Kasembeli, M. M., Robinson, P. & Tweardy, D. J. Targeting Janus Kinases and Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Treat Inflammation, Fibrosis, and Cancer: Rationale, Progress, and Caution. *Pharmacol Rev* **72**, 486–526 (2020).
220. Yu, C.-L. *et al.* Enhanced DNA-Binding Activity of a Stat3-Related Protein in Cells Transformed by the Src Oncoprotein. *Science (1979)* **269**, 81–83 (1995).
221. Stöcklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F. & Groner, B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* **383**, 726–728 (1996).
222. Horvai, A. E. *et al.* Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 1074–1079 (1997).
223. Ram, P. A. & Waxman, D. J. Interaction of Growth Hormone-activated STATs with SH2-containing Phosphotyrosine Phosphatase SHP-1 and Nuclear JAK2 Tyrosine Kinase. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 17694–17702 (1997).
224. Sigurdsson, S. *et al.* Polymorphisms in the Tyrosine Kinase 2 and Interferon Regulatory Factor 5 Genes Are Associated with Systemic Lupus Erythematosus. *The American Journal of Human Genetics* **76**, 528–537 (2005).
225. Duetsch, G. STAT6 as an asthma candidate gene: polymorphism-screening, association and haplotype analysis in a Caucasian sib-pair study. *Hum Mol Genet* **11**, 613–621 (2002).

226. Remmers, E. F. *et al.* STAT4 and the Risk of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine* **357**, 977–986 (2007).
227. Adel, Y., Sabry, M., El-Sabbagh, A. M. & Sadeq, Y. JAK2 mutation may predict response and guide first line treatment in rheumatoid arthritis. *Egypt J Intern Med* **33**, (2021).
228. Gorodetskiy, V. R. *et al.* Analysis of a single-institution cohort of patients with Felty's syndrome and T-cell large granular lymphocytic leukemia in the setting of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* **41**, 147–156 (2021).
229. Sarzi-Puttini, P., Ceribelli, A., Marotto, D., Batticciotto, A. & Atzeni, F. Systemic rheumatic diseases: From biological agents to small molecules. *Autoimmun Rev* **18**, 583–592 (2019).
230. Bedoui, Y. *et al.* Methotrexate an Old Drug with New Tricks. *Int J Mol Sci* **20**, 5023 (2019).
231. Friedman, B. & Cronstein, B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* **86**, 301–307 (2019).
232. Nirk, E. L., Reggiori, F. & Mauthe, M. Hydroxychloroquine in rheumatic autoimmune disorders and beyond. *EMBO Mol Med* **12**, (2020).
233. Guo, Q. *et al.* Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res* **6**, 15 (2018).
234. Niknahad, H. *et al.* Sulfasalazine induces mitochondrial dysfunction and renal injury. *Ren Fail* **39**, 745–753 (2017).
235. Wiese, M. D. *et al.* Precision Medicine With Leflunomide: Consideration of the DHODH Haplotype and Plasma Teriflunomide Concentration and Modification of Outcomes in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **73**, 983–989 (2021).
236. Belani, P. J., Kavadiachanda, C. G. & Negi, V. S. Comparison between leflunomide and sulfasalazine based triple therapy in methotrexate refractory rheumatoid arthritis: an open-label, non-inferiority randomized controlled trial. *Rheumatol Int* **42**, 771–782 (2022).
237. Boutet, M.-A. *et al.* Novel insights into macrophage diversity in rheumatoid arthritis synovium. *Autoimmun Rev* **20**, 102758 (2021).
238. You, H. *et al.* JAK Inhibitors: Prospects in Connective Tissue Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* **59**, 334–351 (2020).
239. Hu, C.-J. *et al.* Effectiveness of iguratimod as monotherapy or combined therapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *J Orthop Surg Res* **16**, 457 (2021).
240. Xie, Z., Yang, X., Duan, Y., Han, J. & Liao, C. Small-Molecule Kinase Inhibitors for the Treatment of Nononcologic Diseases. *J Med Chem* **64**, 1283–1345 (2021).
241. Edwards, J. C. W. *et al.* Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* **350**, 2572–2581 (2004).

242. Radner, H. & Aletaha, D. Anti-TNF in rheumatoid arthritis: an overview. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **165**, 3–9 (2015).
243. Raimondo, M. G., Biggioggero, M., Crotti, C., Becciolini, A. & Favalli, E. G. Profile of sarilumab and its potential in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug Des Devel Ther* **Volume 11**, 1593–1603 (2017).
244. Smolen, J. S. *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2022 update. *Ann Rheum Dis* **82**, 3–18 (2023).
245. Van Der Heijden, J. W. *et al.* Folate receptor β as a potential delivery route for novel folate antagonists to macrophages in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* **60**, 12–21 (2009).
246. Xue, C. *et al.* Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway: autoimmune disorders and cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01468-7> (2023).
247. Shawky, A. M., Almalki, F. A., Abdalla, A. N., Abdelazeem, A. H. & Gouda, A. M. A Comprehensive Overview of Globally Approved JAK Inhibitors. *Pharmaceutics* **14**, 1001 (2022).
248. Leroy, E. & Constantinescu, S. N. Rethinking JAK2 inhibition: towards novel strategies of more specific and versatile janus kinase inhibition. *Leukemia* **31**, 1023–1038 (2017).
249. Vainchenker, W. *et al.* JAK inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms and other disorders. *F1000Res* **7**, 82 (2018).
250. T. Virtanen, A., Haikarainen, T., Raivola, J. & Silvennoinen, O. Selective JAKinibs: Prospects in Inflammatory and Autoimmune Diseases. *BioDrugs* **33**, 15–32 (2019).
251. Andraos, R. *et al.* Modulation of Activation-Loop Phosphorylation by JAK Inhibitors Is Binding Mode Dependent. *Cancer Discov* **2**, 512–523 (2012).
252. Wu, S.-C. *et al.* Activity of the Type II JAK2 Inhibitor CHZ868 in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* **28**, 29–41 (2015).
253. Rusiñol, L. & Puig, L. Tyk2 Targeting in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms24043391> (2023).
254. Mascarenhas, J. & Hoffman, R. Ruxolitinib: The First FDA Approved Therapy for the Treatment of Myelofibrosis. *Clinical Cancer Research* **18**, 3008–3014 (2012).
255. Raedler, L. A. Jakafi (Ruxolitinib): First FDA-Approved Medication for the Treatment of Patients with Polycythemia Vera. *Am Health Drug Benefits* **8**, 75–9 (2015).
256. Bonelli, M. *et al.* Selectivity, efficacy and safety of JAKinibs: New evidence for a still evolving story. *Annals of the Rheumatic Diseases* vol. 83 139–160 Preprint at <https://doi.org/10.1136/ard-2023-223850> (2023).
257. Harrington, R., Al Nokhatha, S. A. & Conway, R. Jak inhibitors in rheumatoid arthritis: An evidence-based review on the emerging clinical data. *Journal of Inflammation Research* vol. 13 519–531 Preprint at <https://doi.org/10.2147/JIR.S219586> (2020).

258. Duggan, S. & Keam, S. J. Upadacitinib: First Approval. *Drugs* **79**, 1819–1828 (2019).
259. Muensterman, E., Engelhardt, B., Gopalakrishnan, S., Anderson, J. K. & Mohamed, M. F. Upadacitinib pharmacokinetics and exposure-response analyses of efficacy and safety in psoriatic arthritis patients – Analyses of phase III clinical trials. *Clin Transl Sci* **15**, 267–278 (2022).
260. AbbVie U.S. FDA Approves RINVOQ® (Upadacitinib) to Treat Adults and Children 12 Years and Older with Refractory, Moderate to Severe Atopic Dermatitis. <https://news.abbvie.com/2022-01-14-U-S-FDA-Approves-RINVOQ-R-upadacitinib-to-Treat-Adults-and-Children-12-Years-and-Older-with-Refractory,-Moderate-to-Severe-Atopic-Dermatitis> (2022). (Acceso 28/03/2024)
261. AbbVie U.S. RINVOQ® (Upadacitinib) Receives FDA Approval for the Treatment of Adults with Moderately to Severely Active Ulcerative Colitis. <https://news.abbvie.com/2022-03-16-RINVOQ-R-upadacitinib-Receives-FDA-Approval-for-the-Treatment-of-Adults-with-Moderately-to-Severely-Active-Ulcerative-Colitis> (2022). (Acceso 28/03/2024)
262. CIMA. Ficha Técnica XELJANZ 5 mg comprimidos recubiertos con película. https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1171178003/FT_1171178003.html#4 (2022). (Acceso 28/03/2024)
263. CIMA. Ficha técnica OLUMIANT 4 mg comprimidos recubiertos con película. https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1161170010/FT_1161170010.html#4.8 (2021). (Acceso 28/03/2024)
264. Al-Salama, Z. T. & Scott, L. J. Baricitinib: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs* **78**, 761–772 (2018).
265. CIMA. Ficha técnica RINVOQ 15 mg comprimidos de liberación prolongada. https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1191404001/FT_1191404001.html#5 (2019). (Acceso 28/03/2024)
266. Cohen, S. B. *et al.* Long-term safety of tofacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis up to 8.5 years: integrated analysis of data from the global clinical trials. *Ann Rheum Dis* **76**, 1253–1262 (2017).
267. Valenzuela, F. *et al.* Tofacitinib in patients with moderate-to-severe chronic plaque psoriasis: long-term safety and efficacy in an open-label extension study. *British Journal of Dermatology* **179**, 853–862 (2018).
268. Sandborn, W. J. *et al.* Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *New England Journal of Medicine* **376**, 1723–1736 (2017).
269. Strand, V. *et al.* Systematic review and meta-analysis of serious infections with tofacitinib and biologic disease-modifying antirheumatic drug treatment in rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Res Ther* **17**, 362 (2015).
270. Chung, W.-S. *et al.* Rheumatoid arthritis increases the risk of deep vein thrombosis and pulmonary thromboembolism: a nationwide cohort study. *Ann Rheum Dis* **73**, 1774–1780 (2014).
271. Smolen, J. S. *et al.* Safety Profile of Baricitinib in Patients with Active Rheumatoid Arthritis with over 2 Years Median Time in Treatment. *J Rheumatol* **46**, 7–18 (2019).

272. Curtis, J. R. *et al.* Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor: analysis of malignancies across the rheumatoid arthritis clinical development programme. *Ann Rheum Dis* **75**, 831–841 (2016).
273. Maccora, I., Land, P., Miraldi Utz, V. & Angeles-Han, S. T. Therapeutic potential of JAK inhibitors in juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis. *Expert Rev Clin Immunol* **19**, 689–692 (2023).
274. Muller, I. B. *et al.* Methotrexate Provokes Disparate Folate Metabolism Gene Expression and Alternative Splicing in Ex Vivo Monocytes and GM-CSF- and M-CSF-Polarized Macrophages. *Int J Mol Sci* **24**, 9641 (2023).
275. Municio, C. *et al.* Methotrexate selectively targets human proinflammatory macrophages through a thymidylate synthase/p53 axis. *Ann Rheum Dis* **75**, 2157–2165 (2016).
276. Fuentelsaz-Romero, S. *et al.* The Macrophage Reprogramming Ability of Antifolates Reveals Soluble CD14 as a Potential Biomarker for Methotrexate Response in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* **12**, (2021).
277. González de la Aleja, A. *et al.* Activation of LXR Nuclear Receptors Impairs the Anti-Inflammatory Gene and Functional Profile of M-CSF-Dependent Human Monocyte-Derived Macrophages. *Front Immunol* **13**, (2022).
278. Mulder, K. *et al.* Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity* **54**, 1883-1900.e5 (2021).
279. Dick, S. A. *et al.* Three tissue resident macrophage subsets coexist across organs with conserved origins and life cycles. *Sci Immunol* **7**, (2022).
280. Ospelt, C., Gay, S. & Klein, K. Epigenetics in the pathogenesis of RA. *Semin Immunopathol* **39**, 409–419 (2017).
281. Galli, S. J., Borregaard, N. & Wynn, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology* vol. 12 1035–1044 Preprint at <https://doi.org/10.1038/ni.2109> (2011).
282. Locati, M., Curtale, G. & Mantovani, A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **15**, 123–147 (2020).
283. Zhang, D. *et al.* Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature* **574**, 575–580 (2019).
284. Chen, A. N. *et al.* Lactylation, a Novel Metabolic Reprogramming Code: Current Status and Prospects. *Frontiers in Immunology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.688910> (2021).
285. Malesci, A. *et al.* Tumor-associated macrophages and response to 5-fluorouracil adjuvant therapy in stage III colorectal cancer. *Oncoimmunology* **6**, e1342918 (2017).
286. Labianca, R. & Poletti, P. 5-Fluoruracile e tumori del colon-retto: impiego nella pratica clinica e progetto “MISURA”. *Tumori Journal* **84**, S10–S12 (1998).

287. Itakura, H. *et al.* Tumor-suppressive role of the musculoaponeurotic fibrosarcoma gene in colorectal cancer. *iScience* **26**, 106478 (2023).
288. Alivernini, S., Firestein, G. S. & McInnes, I. B. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity* **55**, 2255–2270 (2022).
289. Kaneda, M. M. *et al.* PI3K γ is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature* **539**, 437–442 (2016).
290. Patel, S. & Werstuck, G. H. Macrophage Function and the Role of GSK3. *Int J Mol Sci* **22**, 2206 (2021).
291. Sutherland, C. What are the bona fide GSK3 Substrates? *Int J Alzheimers Dis* **2011**, (2011).
292. Pal, R., Bondar, V. V., Adamski, C. J., Rodney, G. G. & Sardiello, M. Inhibition of ERK1/2 Restores GSK3 β Activity and Protein Synthesis Levels in a Model of Tuberous Sclerosis. *Sci Rep* **7**, 4174 (2017).
293. Evangelisti, C., Chiarini, F., Paganelli, F., Marmioli, S. & Martelli, A. M. Crosstalks of GSK3 signaling with the mTOR network and effects on targeted therapy of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1867**, 118635 (2020).
294. Pyonteck, S. M. *et al.* CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med* **19**, 1264–1272 (2013).
295. Cassetta, L. & Pollard, J. W. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **17**, 887–904 (2018).
296. Beltraminelli, T. & De Palma, M. Biology and therapeutic targeting of tumour-associated macrophages. *J Pathol* **250**, 573–592 (2020).
297. Ries, C. H. *et al.* Targeting Tumor-Associated Macrophages with Anti-CSF-1R Antibody Reveals a Strategy for Cancer Therapy. *Cancer Cell* **25**, 846–859 (2014).
298. Waterborg, C. E. J. *et al.* Protective Role of the MER Tyrosine Kinase via Efferocytosis in Rheumatoid Arthritis Models. *Front Immunol* **9**, (2018).
299. van Lent, P. L. *et al.* Uptake of apoptotic leukocytes by synovial lining macrophages inhibits immune complex-mediated arthritis. *J Leukoc Biol* **70**, 708–14 (2001).
300. Kai, K. *et al.* Synovial-tissue resident macrophages play proinflammatory functions in the pathogenesis of RA while maintaining the phenotypes in the steady state. *Immunol Med* **47**, 58–67 (2024).
301. Del Sordo, L. *et al.* Impaired Efferocytosis by Synovial Macrophages in Patients With Knee Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology* **75**, 685–696 (2023).
302. Xu, L. *et al.* Soluble TAM receptor tyrosine kinases in rheumatoid arthritis: correlation with disease activity and bone destruction. *Clin Exp Immunol* **192**, 95–103 (2018).
303. Gerlach, B. D. *et al.* Efferocytosis induces macrophage proliferation to help resolve tissue injury. *Cell Metab* **33**, 2445–2463.e8 (2021).
304. Doran, A. C., Yurdagul, A. & Tabas, I. Efferocytosis in health and disease. *Nat Rev Immunol* **20**, 254–267 (2020).

305. Tran, M. T. N. *et al.* MafB is a critical regulator of complement component C1q. *Nat Commun* **8**, 1700 (2017).
306. Akakura, S. *et al.* The opsonin MFG-E8 is a ligand for the $\alpha\beta 5$ integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res* **292**, 403–416 (2004).
307. Ma, Z. *et al.* Extracellular vesicles containing MFGE8 from colorectal cancer facilitate macrophage efferocytosis. *Cell Communication and Signaling* **22**, 295 (2024).
308. Lin, J. *et al.* MerTK-mediated efferocytosis promotes immune tolerance and tumor progression in osteosarcoma through enhancing M2 polarization and PD-L1 expression. *Oncoimmunology* **11**, (2022).
309. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683–765 (2001).
310. Cuevas, V. D. *et al.* *IL-10-Dependent Profile of Activated M-CSF-Primed Macrophages The Gene Signature of Activated M-CSF-Primed Human Macrophages Is IL-10-Dependent.*
311. Fan, W. *et al.* FoxO1 regulates Tlr4 inflammatory pathway signalling in macrophages. *EMBO J* **29**, 4223–4236 (2010).
312. Tubbs, A. & Nussenzweig, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell* **168**, 644–656 (2017).
313. Jackson, A. L. & Loeb, L. A. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **477**, 7–21 (2001).
314. Li, T. & Chen, Z. J. The cGAS–cGAMP–STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. *Journal of Experimental Medicine* **215**, 1287–1299 (2018).
315. Ishikawa, H., Ma, Z. & Barber, G. N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* **461**, 788–792 (2009).
316. Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674–678 (2008).
317. Vanpouille-Box, C., Hoffmann, J. A. & Galluzzi, L. Pharmacological modulation of nucleic acid sensors - therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 845–867 (2019).
318. Lam, K. C. *et al.* Microbiota triggers STING-type I IFN-dependent monocyte reprogramming of the tumor microenvironment. *Cell* **184**, 5338-5356.e21 (2021).
319. Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C. & Wagner, U. The CD14 bright CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum* **64**, 671–677 (2012).
320. Yoon, B. R. *et al.* Functional Phenotype of Synovial Monocytes Modulating Inflammatory T-Cell Responses in Rheumatoid Arthritis (RA). *PLoS One* **9**, e109775 (2014).

321. Smiljanovic, B. *et al.* Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint. *Ann Rheum Dis* **77**, 300–308 (2018).
322. Hanlon, M. M. *et al.* Rheumatoid arthritis macrophages are primed for inflammation and display bioenergetic and functional alterations. *Rheumatology* **62**, 2611–2620 (2023).
323. Tsukamoto, M. *et al.* CD14brightCD16+ intermediate monocytes are induced by interleukin-10 and positively correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **19**, 28 (2017).
324. Wong, K. L. *et al.* The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* **53**, 41–57 (2012).
325. Szekanecz, Z. *et al.* Efficacy and safety of JAK inhibitors in rheumatoid arthritis: update for the practising clinician. *Nature Reviews Rheumatology* vol. 20 101–115 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41584-023-01062-9> (2024).
326. Sunzini, F., McInnes, I. & Siebert, S. JAK inhibitors and infections risk: focus on herpes zoster. *Ther Adv Musculoskelet Dis* **12**, 1759720X2093605 (2020).
327. Almanzar, G. *et al.* Tofacitinib modulates the VZV-specific CD4+ T cell immune response in vitro in lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **58**, 2051–2060 (2019).
328. Kim, H. & Seed, B. The transcription factor MafB antagonizes antiviral responses by blocking recruitment of coactivators to the transcription factor IRF3. *Nat Immunol* **11**, 743–750 (2010).
329. Motohashi, H. & Igarashi, K. MafB as a type I interferon rheostat. *Nat Immunol* **11**, 695–696 (2010).

Participación en otras publicaciones durante el desarrollo de la tesis

1. Muller IB, Lin M, de Jonge R, Will N, **López-Navarro B**, van der Laken C, Struys EA, Oudejans CBM, Assaraf YG, Cloos J, Puig-Kröger A, Jansen G. Methotrexate Provokes Disparate Folate Metabolism Gene Expression and Alternative Splicing in Ex Vivo Monocytes and GM-CSF- and M-CSF-Polarized Macrophages. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 1;24(11):9641. doi: 10.3390/ijms24119641. PMID: 37298590; PMCID: PMC10253671.
2. Ríos I, Herrero C, Torres-Torresano M, **López-Navarro B**, Schiaffino MT, Díaz-Crespo F, Nieto-Valle A, Samaniego R, Sierra-Palomares Y, Oliver E, Revuelta-Salgado F, García-Luján R, Sánchez-Mateos P, Delgado R, Puig-Kröger A, Corbí AL. Re-programming of GM-CSF-dependent alveolar macrophages through GSK3 activity modulation. *eLIFE.* 2024 Aug. doi: 10.1101/2024.08.20.608749 (artículo actualmente pendiente de revisión por pares).

