

Laura Comas Calmet

Aplicación de nanomateriales al
estudio y modulación de la
respuesta inflamatoria en
patologías inflamatorias y cáncer

Director/es

Pardo Jimeno, Julián
Gálvez Buerba, Eva

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

APLICACIÓN DE NANOMATERIALES AL ESTUDIO
Y MODULACIÓN DE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA EN PATOLOGÍAS
INFLAMATORIAS Y CÁNCER

Autor

Laura Comas Calmet

Director/es

Pardo Jimeno, Julián
Gálvez Buerba, Eva

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2020

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza



Aragón
Instituto de Investigación
Sanitaria Aragón



**INSTITUTO DE
CARBOQUIMICA**



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Tesis Doctoral

“Aplicación de nanomateriales al estudio y modulación de la respuesta inflamatoria en patologías inflamatorias y cáncer”

Memoria presentada por:

Laura Comas Calmet

Licenciado en Bioquímica para optar al grado de
Doctor en Ciencias por la Universidad de Zaragoza

Septiembre 2020



**Universidad
Zaragoza**



**Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza**



IIS Aragón

Instituto de Investigación
Sanitaria Aragón



**INSTITUTO DE
CARBOQUIMICA**



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Dña. **Eva M^a Gálvez Buerba**, Doctora en Ciencias y Científica Titular en el Instituto de Carboquímica (ICB, CSIC) y D. **Julián Pardo Jimeno**, Doctor en Ciencias e Investigador ARAID en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA) de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: *“Aplicación de nanomateriales al estudio y modulación de la respuesta inflamatoria en patologías inflamatorias y cáncer”*, ha sido realizada por la Licenciada en Bioquímica **Laura Comas Calmet** en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo nuestra dirección y que reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para que su autor pueda optar al Grado de Doctor en Ciencias por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, 22 de agosto de 2020

Fdo. **Eva M^a Gálvez Buerba**.

Fdo. **Julián Pardo Jimeno**.

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca de contratación de personal investigador predoctoral en formación del Gobierno de Aragón (BOA 71.41.ª/2014).

“La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante.”

Miguel de Unamuno

7-AAD: 7-Amino-Actinomicina D

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de la varianza (del inglés, "Analysis Of Variance")

APC: Alofococianina (del inglés, "Allophycocyanine")

APC: Célula presentadora de antígeno (del inglés, "Antigen Presenting Cell")

AR: Artritis reumatoide

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato (del inglés, "Adenosine Triphosphate")

AuNP: Nanopartícula de oro

BMDC: Célula dendrítica derivada de la medula ósea (del inglés, "Bone Marrow Derived Dendritic Cell")

BMDM: Macrófago derivado de la medula ósea (del inglés, "Bone Marrow Derived Macrophage")

BMGY: Medio tamponado rico en glicerol (del inglés, "Buffered Glycerol-complex Medium")

BMMY: Medio tamponado rico en metanol (del inglés, "Buffered Methanol-complex Medium")

CAM: Molécula de adhesión (del inglés, "Cell Adhesion Molecule")

CARD: Dominio de reclutamiento de la caspasa (del inglés, "Caspase Recruitment Domain")

CCR: Cáncer colorrectal

CTL: Linfocito T citotóxico (del inglés, "Cytotoxic T Lymphocyte")

CTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (del inglés, "Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4")

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño (del inglés, "Damage Associated Molecular Pattern molecules")

DC: Célula dendrítica (del inglés, "Dendritic Cell")

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DR: Receptor de muerte (del inglés, "Death Receptor")

dsARN: ARN bicatenario (del inglés, "double-stranded")

DTT: Ditioneitol (del inglés, "Dithiothreitol")

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés, "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay")

FDA: Administración de alimentos y medicamentos de los EE. UU. (del inglés, "Food and Drug Administration")

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (del inglés, "Fluorescein Isotiocyanate")

ABREVIATURAS

FRET: Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (del inglés, “Fluorescence Resonance Energy Transfer”)

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (del inglés, “Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase”)

GFP: Proteína fluorescente verde (del inglés, “Green Fluorescent Protein”)

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés, “Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor”)

Gzm: Granzima

HPRT: Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (del inglés, “Hypoxanthineguanine Phosphoribosyltransferase”)

ICIs: Puntos de control inmunitario (del inglés, “*Immune Checkpoint Inhibitors*”)

ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (del inglés, “Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”)

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

ILC: Célula linfoide innata (del inglés, “Innate Lymphoid Cell”)

i.p.: Intraperitoneal

LB: Medio Luria Broth (del inglés, “Lysogeny Broth”)

LB-LS: Medio Luria Broth bajo en sal (del inglés, “Lysogeny Broth-Low Salt”)

LCMV: Virus de la linfocoriomeningitis de ratón (del inglés, “Lymphocytic ChorioMeningitis Virus”)

LPS: Lipopolisacárido

LRRs: Repeticiones ricas en leucinas (del inglés, “*Leucine-Rich Repeats*”)

MACS: Separación magnética por columnas (del inglés, “Magnetic-Activated Cell Sorting”)

M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos (del inglés, “Macrophage Colony Stimulating Factor”)

MFI: Intensidad media de fluorescencia (del inglés, “Median Fluorescence Intensity”)

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, “Major Histocompatibility Complex”)

NACHT/NOD: Dominio central de unión a nucleótidos (del inglés, “Nucleotide-binding and Oligomerization Domain”)

NF- κ B: Factor nuclear kappa B (del inglés, “Nuclear Factor κ B”)

NK: Célula asesina natural (del inglés, “Natural Killer”)

NKT: Célula T asesina natural (del inglés, “Natural Killer T cells”)

NLR: Receptor tipo NOD (del inglés, “NOD Like Receptor”)

NO: Óxido nítrico (del inglés, "Nitric Oxide")

NP: Nanopartícula

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, "Pathogen-Associated Molecular Patterns")

PBMC: Célula mononuclear de sangre periférica (del inglés, "Peripheral Blood Mononuclear Cell")

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, "Phosphate Buffered Saline")

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, "Polymerase Chain Reaction")

PEG: Polietilenglicol

PD-1: Molécula de muerte celular programada 1 (del inglés, "Programmed Death 1")

PD-L1: Ligando de PD-1 (del inglés, "Programmed Death-Ligand 1")

PE: Ficoeritrina (del inglés, "Phycoerythrin")

PerCP: Proteína de peridina-clorofila (del inglés, "Peridinin-Chlorophyll-Protein")

Perf: Perforina

PFA: Paraformaldehído

PMN: Neutrófilo (del inglés, "Polymorphonuclear Neutrophil")

PRR: Receptor de reconocimiento de patrones (del inglés, "Pattern Recognition Receptor")

PS: Fosfatidilserina (del inglés, "Phosphatidylserine")

ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés, "Reactive Oxygen Species")

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

RT: Temperatura ambiente (del inglés, "Room Temperature")

s.c: Subcutáneo

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés, "Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis")

SEM: Error estándar de la media (del inglés, "Standard Error of the Mean")

SFB: Suero fetal bovino

siARN: Pequeños fragmentos de ARN de interferencia (del inglés, "small interfering")

ssARN: ARN monocatenario (del inglés, "single-stranded")

SOFA: Score de evaluación secuencial de fallo orgánico relacionado con sepsis (del inglés, "Sequential Organ Failure Assessment")

TAM: Macrófago asociado a tumor (del inglés, "Tumour Associated Macrophage")

T_C: Linfocito T citotóxico

TCR: Receptor de antígeno de células T (del inglés, "T-Cell Receptor")

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta (del inglés, "Transforming Growth Factor β ")

T_H: Linfocito T colaborador (del inglés, "T Helper cell")

ABREVIATURAS

TIR: Receptor para IL-1 (del inglés, "Toll/Interleukin-1 Receptor")

TLR: Receptor tipo Toll (del inglés, "Toll Like Receptor")

TME: Microentorno tumoral (del inglés, "Tumour Microenvironment")

TNF: Factor de necrosis tumoral (del inglés, "Tumour Necrosis Factor")

Treg: Linfocito T regulador

TRIS: Tris(hidroxietil)aminometano

UC: Colitis ulcerosa (del inglés, "Ulcerative Colitis")

WT: Fenotipo silvestre (del inglés, "Wild Type")

YPD: Extracto de levadura-peptona-dextrosa (del inglés, "Yeast extract Peptone Dextrose medium")

YPDS: Extracto de levadura-peptona-dextrosa-sorbitol (del inglés, "Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol medium")

ÍNDICE

Capítulo 1 y 2.- INTRODUCCIÓN	3
1.1. Sistema inmune.....	3
1.1.1. Generalidades del sistema inmune	3
1.1.2. Inmunidad innata.....	4
1.1.3. Inmunidad adaptativa.....	5
1.1.3.1. Linfocitos T	6
1.1.3.2. Mecanismos citotóxicos mediados por células efectoras	9
1.1.3.3. Perforina y granzimas.....	11
1.2. Inflamación.....	14
1.2.1. Fisiología y tipos de inflamación	14
1.2.2. Receptores de reconocimiento de patrones	15
1.2.2.1. Receptores tipo Toll.....	17
1.2.2.2. Receptores tipo NOD.....	19
1.2.3. Células y mediadores contributivos en el proceso inflamatorio.....	21
1.2.3.1. Células inmunes innatas implicadas en la respuesta inflamatoria.....	22
1.2.3.2. Mediadores de la inflamación.....	27
1.2.4. Granzima A	32
1.2.4.1. Otras granzimas con propiedades proinflamatorias	34
1.2.4.2. Inhibidores de granzimas: Serpinas.....	35
2.1. Nanotecnología.....	36
2.1.1. Antecedentes históricos de la nanotecnología.....	36
2.1.2. Propiedades de los nanomateriales.....	37
2.1.3. Aplicaciones de las nanopartículas	39
2.2. Nanomedicina	39
2.2.1. Principales ventajas del uso de bio-nanomateriales	40

ÍNDICE

2.2.2. Tipos de nanopartículas aplicadas en biomedicina	41
2.2.2.1. Liposomas	41
2.2.2.2. Quantum Dots	42
2.2.2.3. Nanopartículas poliméricas	42
2.2.2.4. Nanopartículas metálicas	43
2.2.2.5. Nanotubos de carbono	43
2.2.3. Nanopartículas metálicas de oro	44
2.2.3.1. Propiedades ópticas de las AuNPs	44
2.2.3.2. Síntesis, funcionalización y caracterización de las AuNPs	44
2.2.3.3. Aplicaciones de las AuNPs en biomedicina	47
2.2.4. Nanocápsulas de quitosano	48
2.2.4.1. Propiedades del quitosano	48
2.2.4.2. Síntesis de las nanocápsulas poliméricas	48
2.2.4.3. Aplicaciones de las NCs de quitosano en biomedicina	49
2.2.5. Nanopartículas aprobadas actualmente para su uso en clínica	50
2.3. Nanotoxicidad	52
2.3.1. Toxicidad de los nanomateriales	53
2.3.2. Inmunogenicidad de las nanopartículas	53
Capítulo 3.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	57
Capítulo 4.- MATERIALES Y MÉTODOS	63
4.1. Técnicas de biología molecular	63
4.1.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	63
4.1.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	63
4.1.3. Extracción del ADN plasmídico	64
4.1.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	64

4.1.5. Purificación de fragmentos de ADN en gel de agarosa	65
4.1.6. Secuenciación del ADN	65
4.1.7. Digestión del ADN	65
4.1.8. Ligación del ADN.....	66
4.1.9. Diseño de oligonucleótidos y amplificación de secuencias	66
4.1.10. Extracción de ARN y determinación de la expresión génica mediante RT-qPCR.....	68
4.2. Expresión y purificación de la granzima A	68
4.2.1. Plásmido codificante para la gzmA	69
4.2.2. Digestión/linearización y purificación del ADN plasmídico.....	69
4.2.3. Preparación de células electrocompetentes de la cepa de <i>P. pastoris</i> X33	70
4.2.4. Transformación de la cepa de <i>P. pastoris</i> X33	71
4.2.5. Conservación en glicerol de las colonias de <i>P. pastoris</i> X33	71
4.2.6. Expresión de la gzmA en <i>P. pastoris</i> X33	72
4.2.7. Concentración y diálisis de la gzmA.....	73
4.2.8. Purificación por cromatografía de intercambio iónico	73
4.2.9. Activación de la gzmA	74
4.2.10. Determinación de la actividad enzimática de la gzmA mediante absorbancia.....	74
4.2.11. Determinación de la actividad enzimática de la gzmA mediante fluorescencia.....	75
4.3. Análisis e identificación de proteínas.....	75
4.3.1. Cuantificación mediante el método de Bradford	75
4.3.2. Análisis de proteínas por Western-Blot.....	76
4.3.2.1. Extracción de proteínas totales a partir de lisados celulares	76
4.3.2.2. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE.....	76
4.3.2.3. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	77
4.3.2.4. Análisis de proteínas por inmunoblot (Western Blotting).....	77

ÍNDICE

4.3.3. Análisis de proteínas mediante citometría de flujo.....	78
4.3.3.1. Análisis de proteínas extracelulares	78
4.3.3.2. Análisis de proteínas intracelulares.....	78
4.3.3.3. Análisis de los parámetros de muerte celular	79
4.3.4. Análisis de proteínas por ELISA	79
4.3.4.1. Cuantificación de citocinas por ELISA.....	79
4.3.4.2. Cuantificación de granzima A por ELISA.....	80
4.3.4.3. Cuantificación de proteínas mediante tecnología multiplex.....	80
4.4. Cultivos celulares	81
4.4.1. Líneas celulares	81
4.4.2. Mantenimiento de los cultivos celulares.....	81
4.4.3. Determinación de la densidad y viabilidad celular	82
4.4.4. Determinación de la proliferación celular.....	83
4.4.5. Separación de células en gradiente de densidad	84
4.4.6. Congelación y descongelación de las líneas celulares.....	85
4.4.7. Detección y eliminación de <i>Mycoplasma</i> en cultivos celulares.....	85
4.4.8. Inactivación por calor del complemento en el suero fetal bovino.....	86
4.4.9. Generación de sobrenadantes de células X-63Ag8653.....	86
4.4.10. Generación de sobrenadantes de células L929.....	86
4.4.11. Extracción de progenitores hematopoyéticos a partir de médula ósea.....	86
4.4.12. Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea.....	87
4.4.13. Generación de macrófagos derivados de médula ósea.....	87
4.4.13.1. Generación de macrófagos con fenotipo M1 (GM-BMDMs).....	87
4.4.13.2. Generación de macrófagos con fenotipo M2 (BMDMs).....	88
4.5. Transfección de células	88

4.5.1. Transfección transitoria del vector pBABE	88
4.5.2. Separación celular por citometría de flujo y dilución límite para la obtención de líneas transfectantes estables	89
4.6. Microscopia de fluorescencia	90
4.6.1. Microscopia convencional de fluorescencia	90
4.6.2. Microscopia confocal	90
4.7. Ratones	90
4.7.1. Modelos animales	90
4.8. Experimentación <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	91
4.8.1. Generación <i>in vivo</i> de linfocitos Tc mediante la infección con LCMV	91
4.8.2. Separación de poblaciones celulares mediante MACS	92
4.8.3. Inducción de sepsis mediante la infección con <i>E. coli</i>	92
4.8.4. Biodistribución de nanomateriales	92
4.8.5. Inducción de tumores y análisis del desarrollo tumoral	93
4.8.5.1. Explantes	94
4.8.5.2. Análisis de infiltración intratumoral	94
4.9. Análisis estadístico	94
Capítulo 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
5.1. Detección de la actividad de la granzima A mediante el uso de sustratos específicos	99
5.1.1. Estudio inicial de las sondas seleccionadas	99
5.1.2. Estudio de la estabilidad de los péptidos seleccionados	102
5.1.3. Estudio de la sensibilidad mediante el uso de la gzmA recombinante	103
5.1.4. Estudio de la especificidad de los péptidos frente a otras proteasas	105
5.1.5. Validación del sensor de la gzmA en muestras de origen murino y humano	106
5.1.6. Estudio de correlación entre la actividad de la gzmA y el pronóstico de pacientes con sepsis	110

ÍNDICE

5.1.7. Discusión	112
5.2. Ensayos de inhibición de la expresión <i>in vitro</i> de la granzima A.....	115
5.2.1. Estudio de la eficiencia de transfección <i>in vitro</i> de la mGzmA/GFP sobre la línea celular HeLa	115
5.2.2. Estudio del silenciamiento génico <i>in vitro</i> de la mGzmA/GFP mediado por siARNs sobre la línea celular HeLa transfectada.....	118
5.2.3. Estudio de la internalización <i>in vitro</i> de las NCs de quitosano en PBMCs y esplenocitos mediante citometría de flujo	122
5.2.4. Estudio de la biodistribución de las NCs y MCs de quitosano <i>in vivo</i>	125
5.2.5. Discusión	132
5.3. Estudio del efecto de las nanopartículas de oro <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	135
5.3.1. Estudio del efecto de las AuNPs sobre la variación en la expresión de citocinas proinflamatorias en macrófagos M1 y M2 <i>in vitro</i>	135
5.3.2. Estudio del efecto de las AuNPs sobre la maduración de células dendríticas <i>in vitro</i>	141
5.3.3. Estudio del efecto de las AuNPs sobre el crecimiento tumoral del melanoma murino B16 <i>in vivo</i>	144
5.3.4. Estudio del efecto de las AuNPs sobre el perfil de expresión de determinados mediadores implicados en inflamación en melanoma murino B16 <i>in vivo</i>	150
5.3.5. Estudio anatomopatológico del efecto de las AuNPs sobre el melanoma murino B16 <i>in vivo</i>	155
5.3.6. Estudio del efecto de las AuNPs sobre las poblaciones inmunológicas presentes en el microentorno tumoral del melanoma murino B16 <i>in vivo</i>	156
5.3.7. Estudio de la influencia de las AuNPs en el tratamiento con anti-PD-1 del melanoma murino B16 <i>in vivo</i>	161
5.3.8. Discusión	165
Capítulo 6.- CONCLUSIONES.....	173
Capítulo 7.- ANEXOS.....	177
Capítulo 8.- BIBLIOGRAFÍA.....	185

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN	
Figura 1.1.	Sistema inmune innato y adaptativo.
Figura 1.2.	Inhibidores de <i>Immune Checkpoints</i> en el tratamiento del cáncer.
Figura 1.3.	Citotoxicidad mediada por los CTLs.
Figura 1.4.	Mecanismos de acción de la perforina.
Figura 1.5.	Signos cardinales del proceso inflamatorio.
Figura 1.6.	Participación de PAMPs y DAMPs en la inducción de la respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal.
Figura 1.7.	Principales TLRs.
Figura 1.8.	Vías de señalización de los diferentes TLRs en mamíferos.
Figura 1.9.	Mecanismo de activación del inflammasoma NLRP3.
Figura 1.10.	Coordinación de eventos durante la respuesta inflamatoria.
Figura 1.11.	Polarización de macrófagos M1 y M2.
Figura 1.12.	Representación esquemática de la interacción proteasa-sustrato.
Figura 2.1.	Representación gráfica de los principales avances de la nanotecnología en escala cronológica.
Figura 2.2.	Principales parámetros que influyen sobre las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales.
Figura 2.3.	Principales aplicaciones de las NPs.
Figura 2.4.	Esquema comparativo de los diferentes tipos de NPs dentro de su rango de escala nanométrica de 1 a 100 nm.
Figura 2.5.	Esquema de síntesis de las AuNPs mediante reducción química por estrategia “bottom-up”.
Figura 2.6.	El PEG previene la absorción de las NPs por el sistema reticuloendotelial.
Figura 2.7.	Aplicaciones de las AuNPs en diagnóstico y terapia.
Figura 2.8.	Estructura de una nanoemulsión <i>oil-in-water</i> (O/W) o <i>water-in-oil</i> (W/O).
Figura 2.9.	Aplicaciones de las NCs y posibles vías de administración.
Figura 2.10.	Gráfico representativo de los diversos ensayos clínicos en sus diferentes fases de aprobación por la FDA desde el año 2001 hasta 2015.
Figura 2.11.	Factores determinantes de la toxicidad de las NPs.
Figura 2.12.	Toxicidad de las NPs <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .
MATERIALES Y MÉTODOS	
Figura 4.1.	Vector pBABE-puro.
Figura 4.2.	Vector pPICZαA.
Figura 4.3.	Imagen ilustrativa del resultado final obtenido a partir de la técnica de separación de linfocitos de sangre periférica.
RESULTADOS	
Figura 5.1.	Posibles estados en función de la distancia donador-aceptor.
Figura 5.2.	Espectros teóricos de excitación-emisión junto a la estructura molecular de las sondas FAM y DABCYL funcionalizadas en los extremos de una secuencia peptídica.
Figura 5.3.	Eficiencia de quenching entre FAM y DABCYL.
Figura 5.4.	Curvas de calibración de FAM.
Figura 5.5.	Análisis de la estabilidad de las secuencias peptídicas funcionalizadas con FAM y DABCYL.
Figura 5.6.	Sensibilidad de los péptidos P1 y P2 frente a la mGzmA recombinante.
Figura 5.7.	Sensibilidad de P1 frente a la gzmA recombinante.

ÍNDICE

Figura 5.8.	Especificidad de los péptidos frente a diferentes proteasas.
Figura 5.9.	Actividad de la gzmA en lisados de ratones WT, gzmA ^{-/-} y gzmK ^{-/-} infectados con LCMV.
Figura 5.10.	Actividad y concentración de la gzmA en sueros de ratones WT, gzmA ^{-/-} y gzmK ^{-/-} infectados con <i>E. coli</i> .
Figura 5.11.	Actividad y concentración de la gzmA en muestras de sueros de pacientes con sepsis.
Figura 5.12.	Análisis de correlación entre actividad y concentración de la gzmA en muestras de pacientes con sepsis.
Figura 5.13.	Análisis de correlación entre la actividad de la gzmA y el pronóstico de pacientes con sepsis.
Figura 5.14.	Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes mGzmA/GFP y GFP. Determinación de la eficiencia de transfección en la línea celular HeLa.
Figura 5.15.	Análisis de las líneas celulares HeLa-mGzmA/GFP y HeLa-GFP.
Figura 5.16.	Análisis de las curvas de disociación y eficiencia de los oligonucleótidos empleados para el estudio de la expresión de la mGzmA/GFP.
Figura 5.17.	Análisis de la expresión de la mGzmA/GFP mediante RT-qPCR tras el silenciamiento génico con diferentes siARNs sobre la línea celular HeLa.
Figura 5.18.	Análisis de la toxicidad de los complejos siARN-NCs sobre la línea celular HeLa-mGzmA/GFP.
Figura 5.19.	Análisis de la internalización de las NCs de quitosano mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia en esplenocitos y PBMCs.
Figura 5.20.	Análisis de la biodistribución de las NCs_DY780 de quitosano.
Figura 5.21.	Esquema de la metodología inkjet para la preparación de las AuNPs-MCs_Alexa647 y análisis de su internalización en macrófagos.
Figura 5.22.	Análisis de la biodistribución de las MCs de quitosano.
Figura 5.23.	Análisis de la toxicidad de las NCs y MCs administradas para el estudio de biodistribución.
Figura 5.24.	Fenotipado de macrófagos: M1 y M2.
Figura 5.25.	Esquema de la síntesis de las AuNPs seleccionadas para su estudio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .
Figura 5.26.	Análisis del efecto de las AuNPs sobre la expresión de citocinas proinflamatorias en macrófagos M1 y M2.
Figura 5.27.	Análisis del mecanismo a través del cual las AuNPs modulan la respuesta inflamatoria en macrófagos M1.
Figura 5.28.	Análisis del efecto de las AuNPs sobre la maduración de células dendríticas.
Figura 5.29.	Análisis del efecto del LPS sobre el crecimiento de tumores subcutáneos B16.
Figura 5.30.	Análisis del efecto de las AuNPs sobre el crecimiento de tumores subcutáneos B16.
Figura 5.31.	Análisis del efecto de las AuNPs sobre el crecimiento de tumores subcutáneos B16 a largo plazo.
Figura 5.32.	Análisis de la expresión de citocinas proinflamatorias en tumores subcutáneos B16.
Figura 5.33.	Análisis de la expresión de citocinas antiinflamatorias en tumores subcutáneos B16.
Figura 5.34.	Análisis de la expresión de quimiocinas en tumores subcutáneos B16.
Figura 5.35.	Estudio de anatomía patológica de tumores subcutáneos B16 tratados con AuNPs.

Figura 5.36.	Esquema representativo del análisis de las poblaciones inmunológicas en bazo.
Figura 5.37.	Esquema representativo del análisis de las poblaciones inmunológicas en tumores subcutáneos B16.
Figura 5.38.	Análisis de las poblaciones inmunológicas en tumores subcutáneos B16.
Figura 5.39.	Análisis del efecto de las AuNPs sobre tumores subcutáneos B16 tratados con anti-PD-1.
Figura 5.40.	Análisis de la expresión de citocinas pro- y antiinflamatorias de tumores subcutáneos B16 tratados con anti-PD-1.
Figura 5.41.	Análisis de la expresión de quimiocinas de tumores subcutáneos B16 tratados con anti-PD-1.

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN	
Tabla 1.1.	Contenido de los gránulos citotóxicos de CTLs y células NK.
Tabla 1.2.	Actividad y expresión de las diferentes gzsms.
Tabla 1.3.	Principales mediadores en inflamación.
Tabla 1.4.	Principales citocinas pro- y antiinflamatorias implicadas en el proceso inflamatorio.
Tabla 1.5.	Superfamilia de las quimiocinas
Tabla 2.1.	Fármacos basados en nanotecnología y aprobados por la FDA durante los últimos años para su uso en biomedicina.
MATERIALES Y MÉTODOS	
Tabla 4.1.	Componentes de la mezcla de reacción.
Tabla 4.2.	Componentes de la linearización del ADN plasmídico.
Tabla 4.3.	Composición de los geles de electroforesis al 12%.
Tabla 4.4.	Anticuerpos primarios y secundarios empleados para Western-Blot.
Tabla 4.5.	Líneas celulares.
RESULTADOS	
Tabla 5.1.	Score SOFA.

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I	Composición de las soluciones empleadas.
Anexo II	Paneles de citometría para el análisis multiparamétrico de los marcajes celulares.
Anexo III	Análisis del efecto de diferentes tipos de AuNPs sobre la expresión de citocinas proinflamatorias en macrófagos M1.

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1 y 2.- INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema inmune

1.1.1. Generalidades del sistema inmune

Nuestro entorno contiene una amplia gama de microbios patógenos y sustancias tóxicas que desafían al huésped mediante una selección muy amplia de mecanismos patogénicos. Es por ello por lo que el sistema inmunológico, nuestro sistema de defensa, está formado por una red compleja de células, tejidos y órganos que funcionan en cooperación, para el reconocimiento de estos agentes invasores, a través de una serie de procesos biológicos que permiten mantener el equilibrio interno u homeostasis. Una característica general del sistema inmune, es que estos mecanismos se basan en la detección de características estructurales del patógeno o toxina, que lo marcan como distinto de la célula huésped ¹.

En función de la velocidad de respuesta y de la especificidad de reacción, podemos encontrar dos tipos de sistemas o componentes que colaboran sinérgicamente para proteger al organismo: inmunidad innata e inmunidad adaptativa (Figura 1.1.). De hecho, la activación de la inmunidad innata no solo supone la primera línea de defensa, sino que, la forma y el contexto en que se produce la activación de esta respuesta, determina como va a ser la activación posterior de la inmunidad adaptativa ². A pesar de esta estrecha relación, cada una de ellas presenta características propias que las diferencia entre sí.

INTRODUCCIÓN

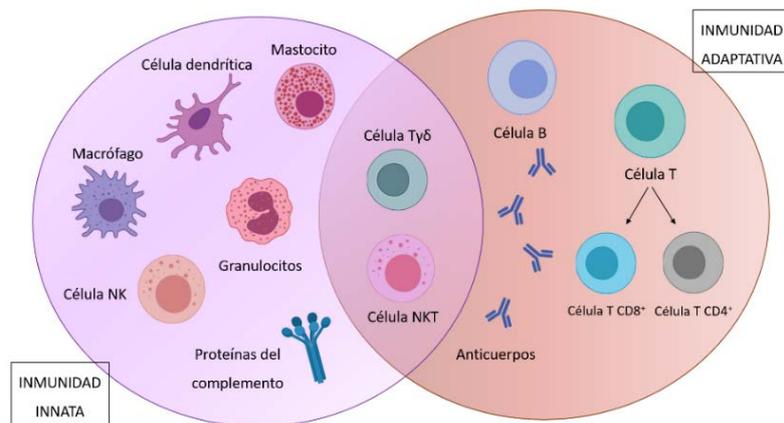


Figura 1.1.- Sistema inmune innato y adaptativo. La respuesta inmune innata funciona como primera línea de defensa contra infecciones y está constituida por factores solubles, como las proteínas del complemento, y por diversos componentes celulares, incluidos granulocitos (basófilos, eosinófilos y neutrófilos), mastocitos o macrófagos entre otros. La respuesta inmunológica adaptativa se desarrolla más lentamente, pero se manifiesta como un aumento de especificidad antigénica y de memoria. Consiste en anticuerpos, células B y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Tanto las células NKT como las células Tγδ, son linfocitos citotóxicos que se encuentran en la interfaz de ambos sistemas. Adaptación de ³.

1.1.2. Inmunidad innata

El sistema inmune innato es la respuesta dominante y evolutivamente más antigua del sistema inmunológico presente en plantas, hongos, insectos y organismos multicelulares ⁴. La diversidad y especificidad limitadas de la respuesta innata suponen que no necesite adaptarse al microorganismo invasor, por lo que el tiempo de reacción es rápido. Se trata de una primera línea de defensa altamente efectiva en la que se incluyen barreras físicas y químicas como la piel o las mucosas ⁵.

A pesar de que todas las células del organismo pueden intervenir en la respuesta innata, destacan principalmente granulocitos, monocitos, macrófagos (MØ), células dendríticas (DCs; del inglés, "Dendritic Cells") y células linfoides innatas (ILCs; del inglés, "Innate Lymphoid Cells"), así como componentes del sistema del complemento, una gran variedad de citocinas y moléculas solubles como son las proteínas de fase aguda ⁶.

Entre las principales funciones de la respuesta innata encontramos: la identificación y eliminación de sustancias extrañas, el reclutamiento de células inmunológicas al lugar de la infección mediante la producción de determinados mediadores, la activación de la cascada del complemento o la activación del sistema inmune adaptativo; todas ellas participes en la respuesta inflamatoria como veremos en el Apartado 1.2. ⁷.

1.1.3. Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa, también conocida como inmunidad adquirida, es una respuesta compleja y precisa, aunque más lenta que la respuesta innata ya que se desarrolla varios días o semanas después de la infección inicial. Se caracteriza por su especificidad y diversidad debido a que los receptores de reconocimiento de antígeno están codificados por segmentos génicos que sufren recombinación somática ⁸, así como por presentar memoria inmunológica, es decir, el reconocimiento posterior del mismo agente patógeno conlleva a una respuesta más rápida y eficaz ⁶. Al igual que la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa esta mediada por dos tipos de respuesta, inmunidad humoral e inmunidad celular, en este caso llevadas a cabo por linfocitos B y T respectivamente. Ambos tipos celulares se generan en la medula ósea a partir del mismo precursor hematopoyético CLP (del inglés, "Common Lymphoid Progenitor") y presentan tolerancia frente a antígenos propios. Sin embargo, las células B y T se distinguen tanto en la diferenciación como en sus receptores de antígeno.

La respuesta inmune humoral o de células B se centra en la producción de anticuerpos. Los anticuerpos son glicoproteínas que reconocen los antígenos microbianos marcándolos para su posterior eliminación a cargo de las células fagocíticas. Cuando una célula B reconoce por primera vez el antígeno que corresponde a su anticuerpo unido a membrana, la unión antígeno-anticuerpo hace que se produzca la diferenciación de células B de memoria y una expansión clonal de células B efectoras, también conocidas como células plasmáticas, con el fin de sintetizar grandes cantidades de inmunoglobulinas (Igs) ⁶.

La respuesta inmune celular o de células T fomenta la destrucción de microorganismos residentes en los fagocitos, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes generados a partir de la inmunidad humoral, así como la eliminación de células infectadas o transformadas. Durante el desarrollo de las células T en el timo tienen lugar dos tipos de procesos de selección: selección positiva que permite la conservación de las células que reconocen moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; del inglés, "Major Histocompatibility Complex") propias eliminando así células hipo-reactivas ⁹, y selección negativa que detecta y elimina células T con alta afinidad por antígenos propios evitando la auto-reactividad ¹⁰. Tras esta doble selección, solo un pequeño porcentaje de linfocitos T continúan con el proceso de maduración y diferenciación.

INTRODUCCIÓN

1.1.3.1. Linfocitos T

Los linfocitos T son elementos imprescindibles de la inmunidad adaptativa y suponen entre el 60 y 80% de los linfocitos circulantes. En función de su fenotipo encontramos dos poblaciones principales: linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ (del inglés, “Cluster of Differentiation”); aunque existen otros tipos de linfocitos T menos frecuentes como es el caso de los linfocitos T $\gamma\delta$ y las células NKT invariantes (iNKT; del inglés, “invariant Natural Killer T cells”), que actúan como soporte de las células T convencionales o en situaciones donde éstas no pueden responder.

Los linfocitos T CD4⁺ actúan como células *helper* o colaboradoras (T_H) y son los encargados de regular y amplificar la respuesta por medio de la secreción de citocinas capaces de estimular a la práctica totalidad de las células del sistema inmune, así como a células no inmunológicas. Los CD4⁺ reconocen antígenos unidos a moléculas MHC de clase II presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APCs; del inglés, “Antigen-Presenting Cells”). Según sus funciones y el patrón de expresión de citocinas y factores de transcripción, estos linfocitos a su vez se dividen en subgrupos: T_H1, involucrados en la inmunidad celular favorecen la proliferación de los linfocitos T citotóxicos (CTLs; del inglés, “Cytolytic T Lymphocytes”) mediante la producción de interferón- γ (IFN- γ), IL-2 y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α ; del inglés “Tumour Necrosis Factor α ”) ¹¹; T_H2, inductores de la inmunidad humoral a través de IL-4, IL-5 e IL-13 ¹²; T_H17, encargados de controlar las respuestas autoinmunes dan lugar a la producción de IL-17 ¹³; y Treg, intervienen en los procesos de autotolerancia ejerciendo funciones inmunosupresoras por medio de TGF- β (del inglés, “Transforming Growth Factor β ”) e IL-2 ¹⁴.

Los linfocitos T CD8⁺ o CTLs son capaces de reconocer antígenos asociados a moléculas MHC de clase I presentes en casi cualquier célula del organismo. Los CTLs son los encargados de reconocer y eliminar de forma específica células propias alteradas, infectadas o transformadas, que representan una amenaza para el funcionamiento normal del organismo.

Ambos linfocitos T se caracterizan por la presencia de un complejo multiprotéico en su membrana plasmática denominado receptor de antígeno de la célula T (TCR; del inglés, “T Cell Receptor”). Una vez el TCR reconoce específicamente el antígeno, los heterodímeros son los encargados de comunicar el reconocimiento de ligando a las subunidades de señalización CD3 a través de sus dominios ITAM (del inglés, “Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif”), formando así el complejo TCR-CD3 ¹⁵. Asimismo, la interacción de los linfocitos T con otras células

o su completa activación, no solo depende de la unión mediada por el TCR, sino que también precisa de la participación de otras señales proporcionadas por moléculas accesorias.

Moléculas de adhesión

Las moléculas de adhesión (CAMs; del inglés, “Cell Adhesion Molecules”) son glicoproteínas localizadas en la superficie de la mayoría de las células que constituyen un conjunto de receptores de membrana, entre los que encontramos integrinas como LFA (del inglés, “Lymphocyte Function-associated Antigen”) o Igs como ICAM (del inglés, “Intercellular Adhesion Molecule”) ¹⁶. El incremento de las CAMs durante la interacción del linfocito T con la célula diana permite un contacto más estrecho célula-célula, también conocido como sinapsis inmunológica ¹⁷.

Moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras

Aunque la especificidad del linfocito T está determinada por la unión del TCR al complejo antígeno-MHC, la señal que se genera resulta insuficiente para inducir su activación. Por ello, resulta imprescindible la intervención de una segunda señal o señal co-estimuladora ¹⁷ ya que, de lo contrario, su ausencia puede dar lugar en algunos casos a células anérgicas que no responden o acaban generando tolerancia hacia el antígeno, y en otros, incluso conlleva a la muerte celular ^{18,19}.

Entre las moléculas co-estimuladoras que juegan un papel determinante en la activación de los linfocitos T encontramos a CD28 y CD40L. La molécula CD28 es una glicoproteína que se expresa constitutivamente en la superficie de la mayoría de los linfocitos T. Tras el reconocimiento antigénico inicial, además de aumentar su expresión, se une a sus ligandos CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2) presentes en la superficie de las APCs. CD28 induce la expresión de ciertas citocinas como IL-2, imprescindible en la regulación y homeostasis del sistema inmune ²⁰. Por otro lado, la molécula CD40L se expresa fundamentalmente en la superficie de linfocitos T CD4⁺ activados y se une a CD40 presente tanto en linfocitos B como en APCs. La interacción entre CD40L y CD40 provoca un aumento de moléculas co-estimuladoras y desempeña un papel fundamental en la producción de IL-12 por activación de las APCs, que a su vez activan una respuesta de tipo T_H1 ²¹.

Además de la regulación positiva mediada por moléculas co-estimuladoras, también concurre una regulación negativa durante el reconocimiento del TCR a través de moléculas co-

INTRODUCCIÓN

inhibidoras, impidiendo así que se originen problemas de autoinmunidad por un exceso de “respuesta”. Entre los principales receptores de co-inhibición encontramos CTLA-4 (del inglés, “Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4”) y PD-1 (del inglés, “Programmed Cell Death 1”), moléculas que se expresan en células T previamente activadas e inhiben su proliferación y la expresión de determinadas citocinas²². Ambas moléculas presentan afinidad por diferentes ligandos, CTLA-4 compete con CD28 por la unión a CD80/CD86, mientras que PD-1 se une a PD-L1 (del inglés, “Programmed Death-Ligand 1”) y PD-L2 (del inglés, “Programmed Death-Ligand 2”), moléculas expresadas en APCs y en células tumorales²³⁻²⁶. Destacar que, durante los últimos años, estos mecanismos de control del sistema inmune o *Immune Checkpoints* han revolucionado la inmunoterapia del cáncer convirtiéndose en potentes dianas terapéuticas capaces de revertir situaciones de inmunotolerancia que tienen lugar en el microentorno tumoral (TME; del inglés, “Tumour Microenvironment”). Anticuerpos bloqueantes o ICIs (del inglés, “*Immune Checkpoint Inhibitors*”) de CTLA-4, como Ipilimumab, o de PD-1 y PD-L1, como Nivolumab y Atezolizumab respectivamente, se están utilizando actualmente en la clínica (Figura 1.2.). Sin embargo, la variabilidad de efectos adversos y la aparición de resistencias, han evidenciado la necesidad de continuar con la búsqueda de nuevas alternativas^{27,28}.

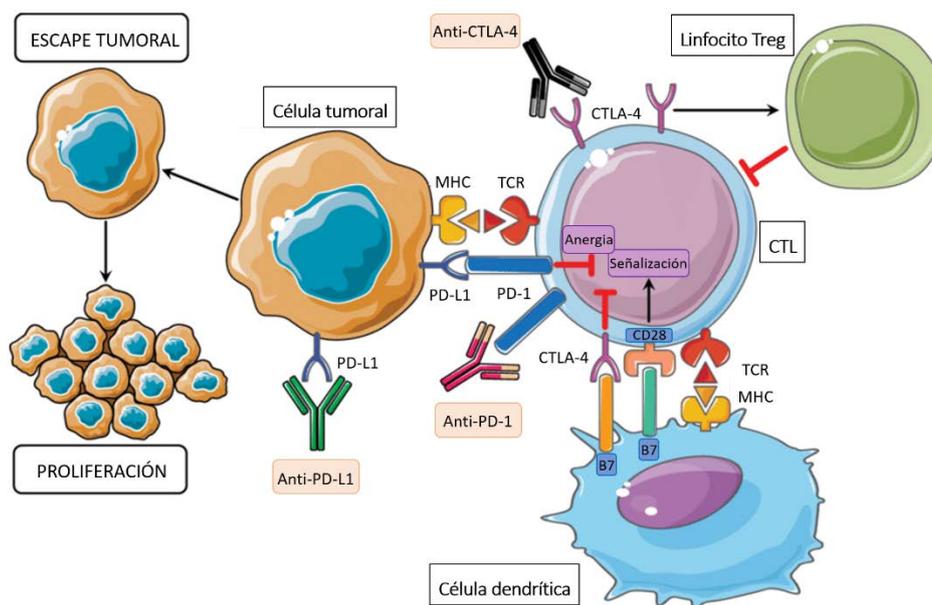


Figura 1.2.- Inhibidores de *Immune Checkpoints* en el tratamiento del cáncer. La incapacidad de activación de los CTLs en el microentorno tumoral debido al efecto supresor de los Treg o de los *Immune Checkpoints*, permite a las células tumorales escapar del sistema inmunológico y proliferar. Los ligandos B7, expresados en las APCs, pueden unirse tanto al receptor CD28, permitiendo la amplificación y señalización de células T, como a CTLA-4, que, por el contrario, suprime su actividad. CTLA-4 además, es capaz de aumentar la actividad de los Treg fomentando el efecto inmunosupresor. Por otro lado, la unión de PD-1 expresado en células T activadas a su ligando PD-L1, potencia las señales inhibitoras mediante el estado de anergia de los CTLs. La inhibición de todos estos puntos de control mediante el uso de anticuerpos monoclonales permite la restauración de la actividad antitumoral de los CTLs. Adaptación de²⁹.

1.1.3.2. Mecanismos citotóxicos mediados por células efectoras

Para una activación completa, tras el reconocimiento antigénico vía TCR y la colaboración de señales co-estimuladoras, los linfocitos T CD8⁺ adquieren capacidades citotóxicas mediante la participación de una tercera señal en la que están implicadas citocinas como IL-12 o IFN tipo I ^{30,31}.

Los linfocitos T_C, junto con las células NK (del inglés, "Natural Killer"), son las principales células efectoras del sistema inmune, involucradas en la eliminación de algunos virus o en la respuesta antitumoral ³². Estas células son capaces de provocar la destrucción de las células diana mediante tres mecanismos: secreción de citocinas, apoptosis mediada por la vía de los ligandos mortales y lisis inducida por la vía de exocitosis granular (Figura 1.3.) ^{33,34}.

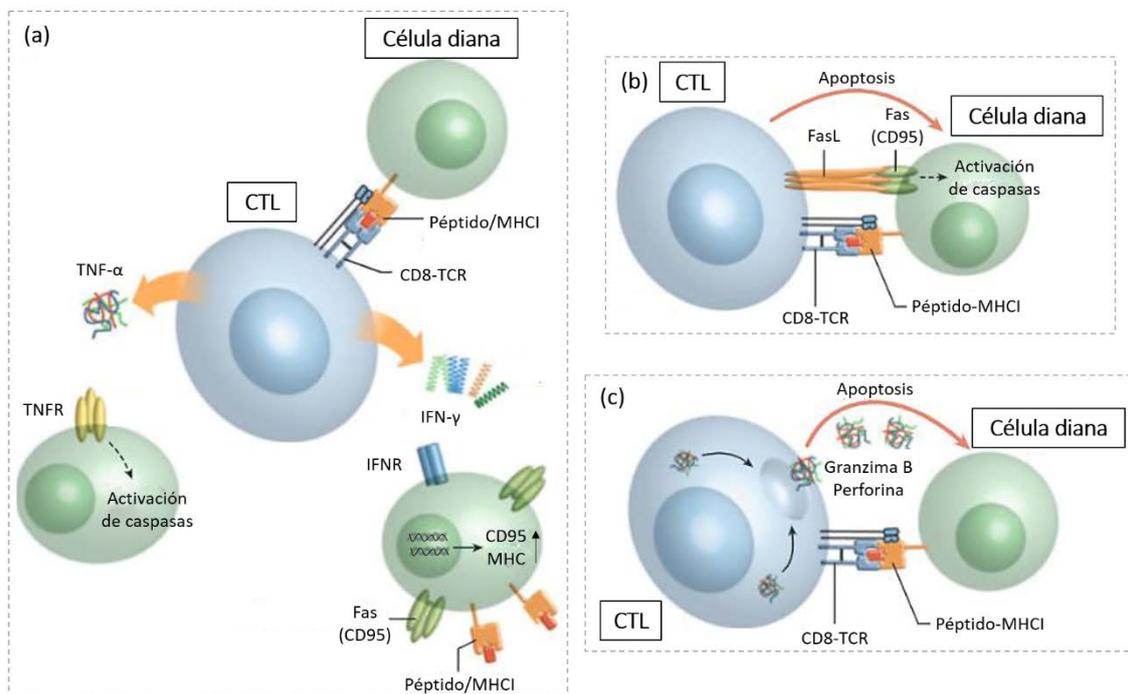


Figura 1.3.- Citotoxicidad mediada por los CTLs. (a) Citotoxicidad indirecta mediada por la secreción de IFN-γ y TNF-α. (b) Inducción de apoptosis sobre la célula diana mediante la activación de los receptores de muerte. (c) Citotoxicidad directa a través de la liberación de granzima B y perforina al espacio intercelular entre el CTL y la célula diana. Adaptación de ³⁵.

Secreción de citocinas

La estimulación del TCR puede dar lugar a la producción y secreción de ciertas citocinas como IFN-γ y TNF-α, las cuales ejercen sus funciones citotóxicas sobre células próximas a la célula T efectora. El IFN-γ incrementa la presentación antigénica mediada por MHC de clase I, así como

INTRODUCCIÓN

la expresión de Fas en células diana, mientras que el TNF- α se une a los receptores de muerte (DRs; del inglés, “Death Receptors”) presentes en las células diana, desencadenando la apoptosis como veremos a continuación a través de la vía de los ligandos de muerte ^{36,37}.

Ligandos de muerte

La apoptosis es un tipo de muerte celular que transcurre con unas características morfológicas bien definidas: reducción del volumen celular, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear ^{38,39}. Durante este proceso tiene lugar la traslocación de la fosfatidilserina (PS; del inglés, “Phosphatidylserine”) desde la cara interna a la cara externa de la bicapa lipídica, así como la formación de burbujas o *blebbing*, provocando que la célula se acabe fragmentando en pequeños cuerpos apoptóticos que posteriormente serán fagocitados ⁴⁰. En respuesta a múltiples factores, la apoptosis puede iniciarse a través de dos vías de señalización: vía intrínseca o mitocondrial ⁴¹ y vía extrínseca o de los receptores mortales ^{42,43}.

La vía extrínseca esta mediada por la unión de los ligandos de muerte como FasL, TRAIL/Apo2L y TNF- α , expresados por las células efectoras, a sus respectivos DRs, superfamilia de receptores del TNF que incluyen a Fas, TRAILR1/2 (del inglés, “TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor”), también conocidos como DR4/DR5, y TNFR ^{44,45}. Tras la unión ligando-receptor, se inicia una vía de transducción en la que participan tanto caspasas ejecutoras como moléculas adaptadoras para inducir la muerte de la célula diana por apoptosis.

Exocitosis granular

Se trata de un proceso regulado que se inicia con la sinapsis inmunológica ⁴⁶ y la consiguiente polarización del centro organizador de microtúbulos (MTOC; del inglés, “Microtubule Organizing Center”) hacia el lugar de contacto con la célula diana ⁴⁷. El ensamblado de microtúbulos permite el tráfico de los gránulos hacia la membrana plasmática, aunque precisa la colaboración de otras proteínas como AP-3 (del inglés, “Adaptor Protein 3”) ⁴⁸, Rab27a ⁴⁹, Munc13-4 ⁵⁰ o SNARE (del inglés, “Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor”), un complejo proteico que facilita la fusión vesicular ⁵¹. Finalmente, la esfingomielinasa ácida (ASM; del inglés, “Acid Sphingomyelinase”) permite la liberación direccional del contenido granular de la célula efectora ⁵².

Las vesículas citotóxicas son orgánulos complejos que no solo contienen proteínas proapoptóticas restringidas a los CTLs y células NK, sino que también contienen otra serie de

moléculas expresadas en el interior de los lisosomas (Tabla 1.1.)⁵³. De entre todas ellas, debemos destacar las proteínas perforina (perf) y granzimas (gzms) debido a que son las principales responsables de desencadenar la lisis celular.

MOLÉCULA	FUNCIÓN
Perforina	Formación de poros
Granzimas	Proteasas de serina
Granulicina	Agente antimicrobiano
Calreticulina	Inhibición de la perforina
Catepsina C	Activación de las granzimas
Proteoglicanos	Unión a granzimas
Catepsina B	Degradación de la perforina
Serpinas	Inhibición de granzimas
Esfingomielinasa ácida	Degradación esfingomielina Exocitosis granular
Catepsina D	Proteasa
Catepsina L	Proteasa
Receptor de manosa-6-fosfato	Tráfico de proteínas
ATPasa-H	Acidificación de los gránulos
Arilsulfatasa	Degradación de polisacáridos
β -Hexosamidasa	Degradación de polisacáridos
β -Glucuronidasa	Degradación de polisacáridos
CD63	Marcador lisosomal
Lamp1/CD107a	Marcador lisosomal
Lamp2/CD107b	Marcador lisosomal

Tabla 1.1.- Contenido de los gránulos citotóxicos de CTLs y células NK. Adaptación de ⁵⁴.

1.1.3.3. Perforina y granzimas

La perf es una proteína perteneciente a la superfamilia MACPF (del inglés, “Membrane Attack Complex/Perforin”), con homología funcional y ultraestructural con la proteína C9 del complemento ⁵⁵, cuya función principal es la formación de poros en la membrana de la célula diana. Está constituida por un dominio N-terminal que contiene un péptido señal responsable de su actividad lítica, un dominio central de hélice de anclaje a la membrana y un dominio tipo EGF (del inglés, “Epidermal Growth Factor”) y C2 de unión a Ca^{2+} en el extremo C-terminal, clave para su activación ⁵⁶⁻⁵⁸.

INTRODUCCIÓN

En el interior de los gránulos citotóxicos, la perf se mantiene en su conformación inactiva debido a que el pH ácido impide la unión de iones Ca^{2+} al dominio C2 por protonación de algunos de sus residuos ⁵⁹, a la vez que la proteína calreticulina unida a la perf actúa como chaperona ⁶⁰. Una vez en el espacio extracelular, el pH neutro y la alta concentración de Ca^{2+} permiten un cambio conformacional de la perf, que a su vez posibilita su inserción en la membrana de la célula diana. Con la consiguiente formación de poros, las gzms son entonces capaces de acceder al citosol de estas células, lugar dónde ejercen sus funciones biológicas como la inducción de apoptosis o la estimulación de una respuesta inflamatoria ⁶¹. A pesar de que el mecanismo a través del cual la perf permite la entrada de gzms al interior de la célula diana todavía no se ha elucidado por completo, debido a la dificultad del estudio *in vivo* y a la falta de reproducibilidad de las condiciones fisiológicas *in vitro* (Figura 1.4.), varios estudios han demostrado que se requiere de una acción sinérgica entre ambos elementos para conseguir finalmente la lisis celular ^{32,62,63}.

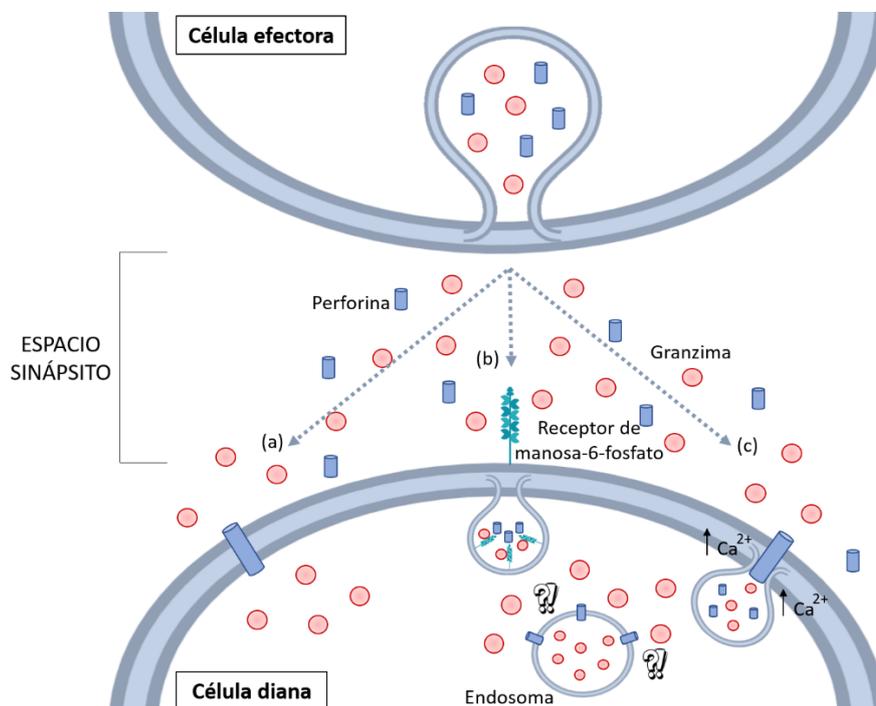


Figura 1.4.- Mecanismos de acción de la perforina. Existen diferentes modelos propuestos para explicar la entrada de gzms mediada por perf al interior de la célula diana. (a) Modelo clásico en el que se considera que la perf forma poros directamente en la membrana plasmática y permite el acceso de gzms al citosol ⁶⁴. Es el modelo más aceptado en la actualidad. (b) Se produce la endocitosis del contenido granular mediada por el receptor de manosa-6-fosfato al interior de la célula, lugar dónde finalmente las gzms son liberadas en un proceso dependiente de perf ⁶⁵. (c) Se trata de un tipo de endocitosis "reparativa" en la que, tras la consiguiente formación de poros llevada a cabo por la perf, la entrada de Ca^{2+} al citoplasma da lugar a la reparación de la membrana, generando endosomas que contienen gzms adheridas debido a su carga. Una vez en el citosol, las gzms son liberadas al espacio intracelular favoreciendo la interacción con sus sustratos específicos para inducir la apoptosis ^{66,67}.

Las gzms son una familia de proteasas de serina identificadas originalmente en el interior de los gránulos citotóxicos^{68,69}. Durante su síntesis, las gzms son procesadas a través del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, siendo finalmente dirigidas a la vía secretoria. Es allí donde la proteasa catepsina C (dipeptidil peptidasa I) degrada la secuencia de dos aminoácidos presentes en el extremo N-terminal de las gzms, permitiéndoles adquirir su conformación activa, ya que inicialmente son sintetizadas como precursores inactivos o zimógenos⁷⁰. Sin embargo, a pesar de presentar su forma activa en el interior de las vesículas, debido al pH ácido de las mismas y a la formación de complejos con proteoglicanos, se mantienen inactivas hasta su liberación al espacio extracelular^{71,72}.

Según su especificidad de corte y su actividad proteolítica, se han identificado diferentes tipos de gzms (Tabla 1.2.): 5 gzms en humanos (A, B, H, K y M) y 10 en ratón (A, B, C, D, E, F, G, K, M y N), siendo en ambos casos la gzmA y gzmB las más abundantes y mejor caracterizadas³⁴. A pesar de que principalmente se encuentran en los gránulos citotóxicos de linfocitos T_C y células NK, también se han localizado en una gran diversidad de diferentes tipos celulares⁷³⁻⁷⁸.

GRANZIMA	ESPECIE	ACTIVIDAD	EXPRESIÓN
A	h, m	Triptasa	CTL, Treg, NK, NKT, GMC, Pne, MØAlv, Plaquetas (h)
B	h, m	ASPasa	CTL, Treg, NK, NKT, Mas, MDSC (h), Bas (h), MØ (h), DC, GMC, Célula B (h), Ser, Pne, Quer
C	m	Quimasa	NK
D	m	Quimasa	GMC
E	m	Quimasa	GMC
F	m	Quimasa	GMC
G	m	Quimasa	GMC
H	h	Quimasa	NK
K	h, m	Triptasa	CTL, NK, NKT (h)
M	h, m	METasa	NK, NKT, T Yδ
N	m	Desconocida	Sper

Tabla 1.2.- Actividad y expresión de las diferentes gzms. h: humano; m: murino; MDSC: Célula supresora de origen mieloide (del inglés, "Myeloid-Derived Suppressor Cells"); Mas: Mastocito; Bas: Basófilo; Ser: Célula de Sertoli; Sper: Espermatozoides; GMC: Célula de la glándula metrial; Pne: Neumocito; Malv: Macrófago alveolar; Quer: Queratinocito. Adaptación de⁷⁹.

Durante años, las gzms fueron descritas por su capacidad para eliminar células infectadas o transformadas mediante la inducción de apoptosis. La gzmB, proteasa con especificidad por residuos de ácido aspártico, es la principal responsable de la inducción de este tipo de muerte

INTRODUCCIÓN

celular^{80,81}. Sin embargo, en la actualidad se ha descrito la participación de las gzmS en otros muchos procesos, como el control de la supervivencia de linfocitos activados y la regulación de la inflamación a través de la modificación de la matriz extracelular o mediante su actuación sobre las células del propio sistema inmune innato^{34,82,83}. De hecho, algunos estudios han demostrado que la gzmA tiene una mayor relevancia fisiológica en procesos inflamatorios como veremos en el Apartado 1.2.4. Lo mismo sucede con otras gzmS menos estudiadas como son la gzmK o gzmM, denominadas gzmS huérfanas, de las que todavía no se conoce con exactitud cuáles son sus funciones biológicas, pero se les atribuyen propiedades proinflamatorias⁸⁴⁻⁸⁶.

1.2. Inflamación

1.2.1. Fisiología y tipos de inflamación

En el siglo I A.C. el médico romano Aulus Cornelius Celsus describió los cuatro signos cardinales de la inflamación: calor, enrojecimiento, hinchazón y dolor⁸⁷. Mas tarde, Rudolph Carl Virchow, un médico alemán, añadió la pérdida de la función como quinto signo (Figura 1.5.) y postuló que la inflamación no puede ser representada como un solo proceso, sino como un conjunto interconectado de varios de ellos⁸⁸.

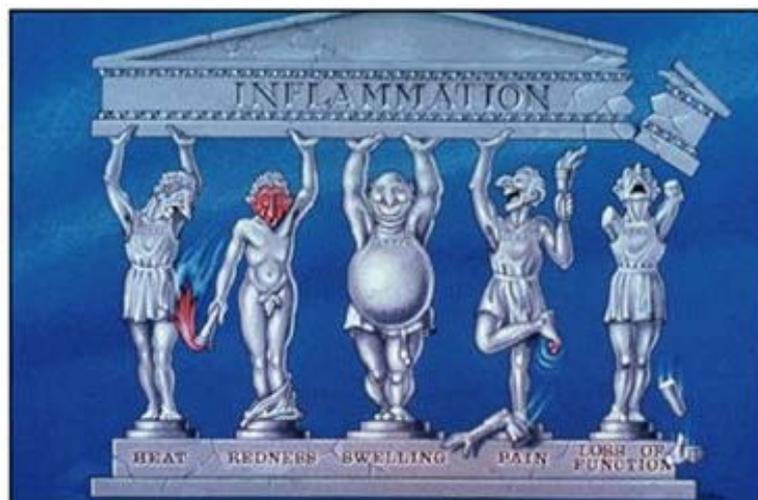


Figura 1.5.- Signos cardinales del proceso inflamatorio. Esta caricatura muestra a cinco griegos que simbolizan los cinco signos cardinales de la inflamación: calor, enrojecimiento, hinchazón, dolor y pérdida de la función; tan apropiados hoy en día como lo fueron al ser descritos por Celsus hace más de 2000 años. Esta figura fue encargada por D.A.W. y dibujada por P. Cull para el Medical Illustration Department del St Bartholomew's Hospital Medical College.

La inflamación puede definirse como un proceso biológico complejo que proporciona herramientas de reparación frente a daños causados por agentes de distinta naturaleza: mecánicos, infecciosos, químicos o ambientales entre otros. Como consecuencia al daño, se producen sustancias nocivas o señales de peligro reconocidas por receptores específicos de las células del sistema inmune y de las propias células del tejido, capaces de inducir una cascada de eventos que constituyen la respuesta inflamatoria. Según la naturaleza y la eficacia de la respuesta, el proceso inflamatorio puede clasificarse como agudo o crónico, por lo que es considerado como un arma de doble filo.

Inflamación aguda

Considerada parte de la inmunidad innata se define como un proceso local, transitorio e inespecífico frecuentemente beneficioso. Esta respuesta inicial se caracteriza por la liberación de numerosos mediadores químicos, y conduce al exudado de líquido y de proteínas plasmáticas (edema) y a la migración de leucocitos, predominantemente neutrófilos, a través de una mayor expresión de CAMs. El balance dinámico entre infiltración, división, migración y muerte celular permite alcanzar la resolución del proceso inflamatorio permitiendo restaurar la homeostasis. Sin embargo, la persistencia de la inflamación aguda puede dar lugar a un proceso inflamatorio crónico ^{89,90}.

Inflamación crónica

Tiene una mayor duración y suele evolucionar en el curso de días o semanas. Se caracteriza por la presencia de células mononucleares (MØ y linfocitos), así como por la proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis tisular. La cronificación de la inflamación presenta un carácter patofisiológico y se asocia con muchas de las enfermedades más prevalentes en la actualidad, como es el caso del cáncer ⁹¹.

1.2.2. Receptores de reconocimiento de patrones

El primer paso para la eliminación de un patógeno es su detección, y para ello las células de la inmunidad innata han desarrollado una estrategia de discriminación entre lo “propio” y lo “no propio”, reconociendo las estructuras conservadas de los microorganismos que no están presentes en el huésped, los denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; del inglés “Pathogen-Associated Molecular Patterns”) ⁹². Los PAMPs han mostrado ser

INTRODUCCIÓN

importantes activadores de la respuesta inmune y entre ellos se incluyen componentes de la membrana como el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas o los peptidoglicanos (PGNs) de bacterias Gram positivas, diversidad de ácidos nucleicos microbianos como ARN bicatenario (dsARN; del inglés, “double-stranded”) y ARN monocatenario (ssARN; del inglés, “single-stranded”), dinucleótidos de citosina y guanina metilados (CpG), y un largo etcétera⁹³.

Asimismo, en 1994 se postuló la “teoría del peligro”⁹⁴, la cual sugiere que las células del sistema inmune innato además de reconocer patógenos, son capaces de reconocer moléculas endógenas producidas por células dañadas o sometidas a estrés, entre las que encontramos el ATP (del inglés, “Adenosine Triphosphate”) o la proteína HMGB1 (del inglés, “High Mobility Group Box 1”) entre otras^{95,96}. Estas sustancias se denominan patrones moleculares asociados al daño tisular (DAMPs; del inglés “Damage-Associated Molecular Patterns”)⁹⁷.

Los receptores a través de los cuales todas estas señales son reconocidas, son los denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs; del inglés, “Pattern Recognition Receptors”)⁹⁸. A pesar de que el sistema inmune innato es un mecanismo celular altamente conservado, estudios filogenéticos han mostrado que los genes de los PRRs se han modificado gradualmente a lo largo de generaciones mediante selección natural, y algunas de estas variaciones se asocian con una mayor susceptibilidad a ciertas enfermedades^{99,100}. Estos receptores pueden expresarse tanto en superficie, como en vesículas fagocíticas o en el citosol de las células, y podemos distinguir cinco familias tipo: Toll (TLRs; del inglés, “Toll Like Receptors”), NOD (NLRs; del inglés, “NOD Like Receptors”)^{101,102}, Lectina tipo C (CLRs; del inglés, “C-type Lectin Receptors”)¹⁰³, RIG-I (RLRs; del inglés, “RIG-I Like Receptors”)¹⁰⁴ y RAGE (del inglés, “Receptor for Advanced Glycation Endproducts”)¹⁰⁵. Cada uno de estos receptores difiere en el reconocimiento de los ligandos, la transducción de señal y su localización subcelular¹⁰⁶. En la Figura 1.6. se muestra de forma simplificada como el reconocimiento de PAMPs y DAMPs da lugar a la activación de la respuesta inmune.

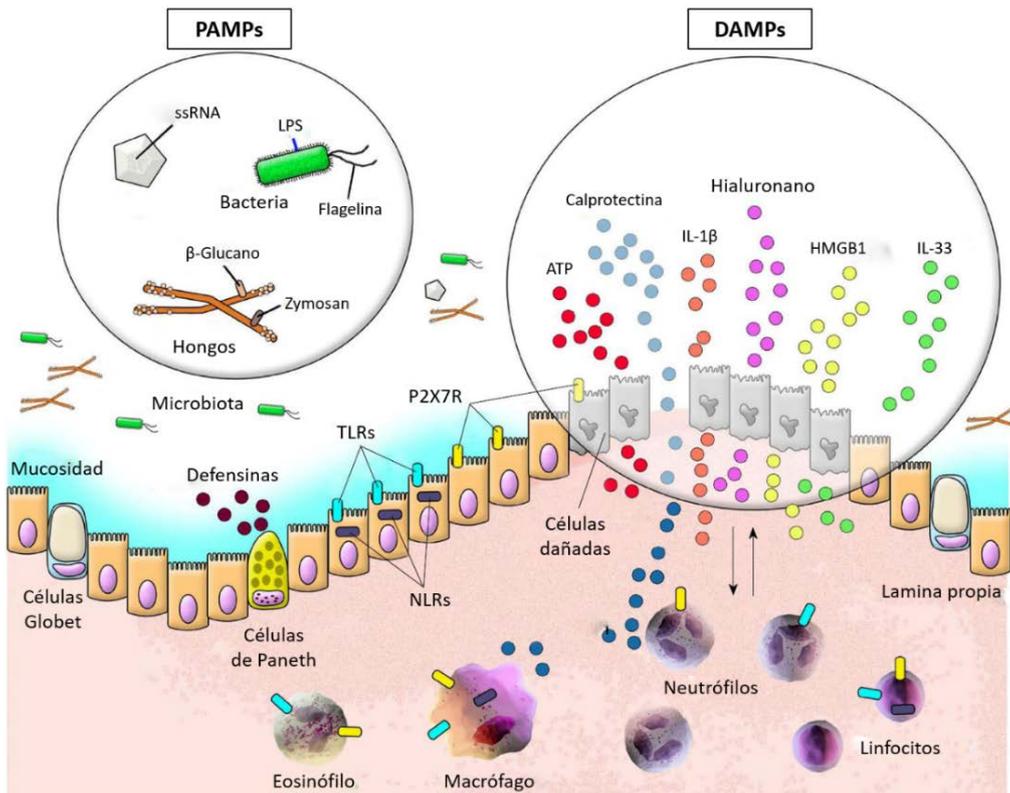


Figura 1.6.- Participación de PAMPs y DAMPs en la inducción de la respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal. Patógenos como virus, bacterias y hongos son capaces de estimular los PRRs promoviendo la producción de citocinas proinflamatorias y el reclutamiento de células inmunes. El daño tisular producido sobre las células da lugar a la generación de DAMPs en el medio extracelular para estimular y amplificar la reacción de inflamación. P2X7R: Receptor de P2X7. Adaptación de ¹⁰⁷.

1.2.2.1. Receptores tipo Toll

Los TLRs fueron descritos por primera vez en *Drosophila melanogaster* ¹⁰⁸ y son los PRRs mejor caracterizados ¹⁰⁹. Se trata de una familia de glicoproteínas transmembranales de tipo I, localizadas tanto a nivel extracelular (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 y 11) como intracelular (TLR3, 7, 8 y 9) que pueden expresarse como homodímeros o heterodímeros (TLR1/TLR2 o TLR2/TLR6) ¹¹⁰ (Figura 1.7.). Estas moléculas constan de un dominio extracelular que determina la especificidad de ligando con repeticiones ricas en leucinas (LRRs; del inglés, "*Leucine-Rich Repeats*"), seguido por una hélice transmembrana simple y un dominio intracelular homólogo al del receptor para IL-1 denominado Toll/IL-1R (TIR; del inglés, "*Toll/Interleukin-1 Receptor*"). Este dominio TIR es el lugar de unión para proteínas intracelulares que promueven la transcripción de genes implicados en la respuesta inmune frente al agente patógeno ¹¹¹. Hasta el momento, se han descrito 15 receptores tipo Toll en mamíferos, de los cuales 10 son los más frecuentes en humanos, y se clasifican en base a sus características genéticas y a su localización ^{112,113}.

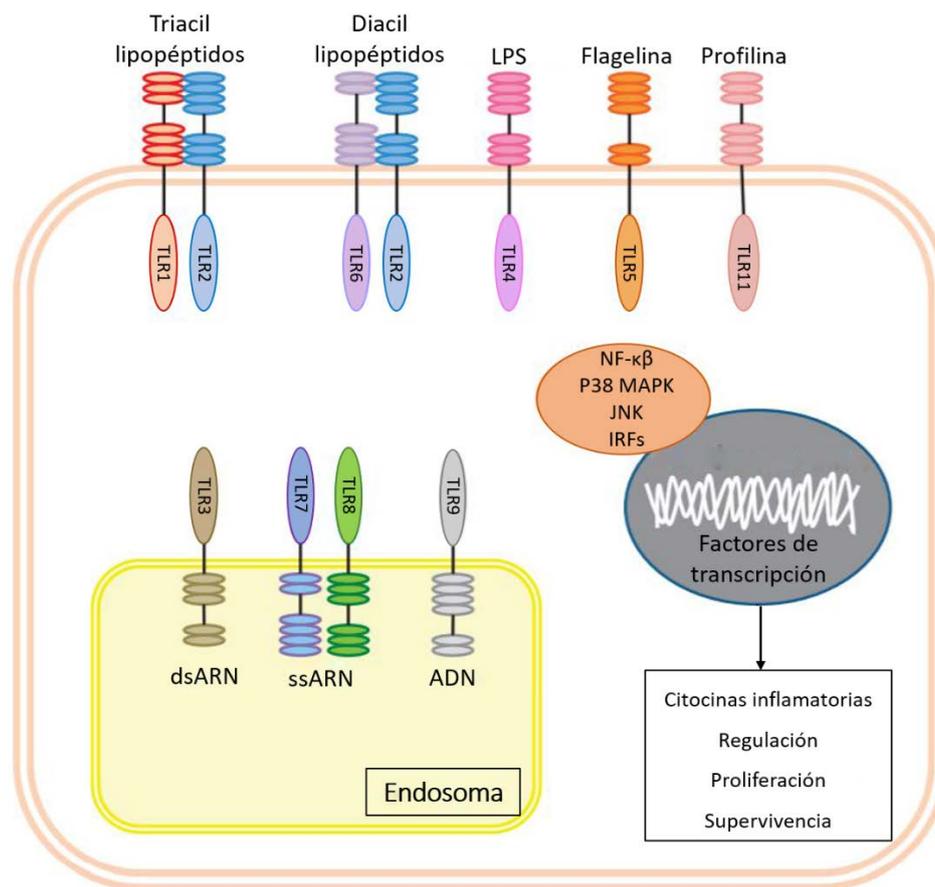


Figura 1.7.- Principales TLRs. Los miembros de la familia TLR reconocen patrones específicos de componentes microbianos. TLR2 reconoce una variedad de lipopéptidos microbianos, como el ácido lipoteicoico o peptidoglicano. TLR1 y TLR6 cooperan con TLR2 para discriminar diferencias sutiles entre triacil y diacil lipopéptidos, respectivamente. TLR3 está implicado en el reconocimiento del dsARN viral, mientras que TLR7 y TLR8 son los receptores del ssARN. TLR4 es el elemento transductor de señales del complejo de receptores del LPS y también está implicado en la respuesta de señalización a otros estímulos exógenos. TLR5 se une a la flagelina, proteína bacteriana implicada en la motilidad, y TLR9 reconoce los CpG, secuencia repetitiva de ácidos nucleicos no metilados. MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos; JNK: Quinasa c-Jun N-terminal; IRFs: Factor regulador de IFN. Adaptación de 114.

Los TLRs se localizan tanto en células del sistema inmune (DCs, MØ, células NK, monocitos, mastocitos, PMNs y linfocitos T y B) como en células no inmunológicas (fibroblastos, células epiteliales y queratinocitos) ¹¹⁵. Sin embargo, independientemente del tipo celular en el que se encuentra el TLR, cada receptor reconoce un PAMP específico y adapta la respuesta al tipo de patógeno. Tras la unión del ligando, los TLRs dimerizan y experimentan cambios conformacionales necesarios para el reclutamiento de moléculas adaptadoras, las cuales se unen a través de sus dominios TIR. A partir de entonces, podemos diferenciar entre dos vías principales de señalización (Figura 1.8.): dependiente e independiente de la proteína MyD88 (del inglés, “Myeloid Differentiation primary response 88”) ¹¹⁶⁻¹¹⁹, las cuales producen la activación de distintas cascadas de señalización como la del factor nuclear kappa B (NF-κB; del inglés, “Nuclear

Factor- κ B”), con la consecuente producción de citocinas, quimiocinas y un aumento en la expresión de CAMs y moléculas de co-estimulación ¹²⁰, participes en la respuesta inmune adaptativa, tal y como se describía en el Apartado 1.1.3.

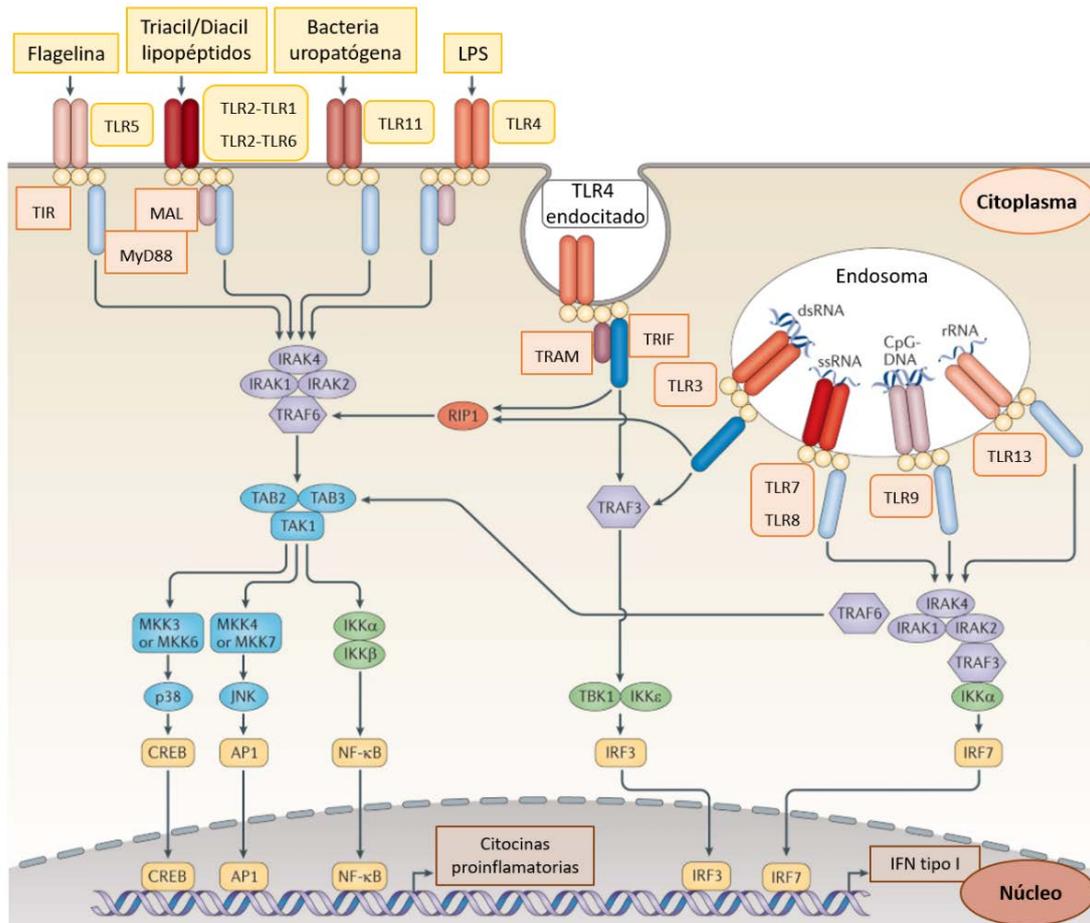


Figura 1.8.- Vías de señalización de los diferentes TLRs en mamíferos. TLR5, TLR11, TLR4 y los heterodímeros TLR2-TLR1 o TLR2-TLR6 se unen a sus respectivos ligandos en la membrana de las células, mientras TLR3, TLR7-TLR8, TLR9 y TLR13 se localizan en endosomas, donde son capaces de detectar ácidos nucleicos microbianos y endógenos. El ambiente ácido y las enzimas presentes en los endosomas son esenciales para la degradación del material y la óptima activación de dichos receptores. Podemos encontrar TLR4 tanto en la membrana plasmática como en endosomas. TAB: Proteína de unión a TAK (del inglés, “Transforming growth factor (TGF) - β -Activated Kinases”). Adaptación de ¹²¹.

1.2.2.2. Receptores tipo NOD

Se trata de una familia constituida por 23 receptores en humanos y 34 en ratón, presentes en el citoplasma de las células, actúan reconociendo componentes microbianos intracelulares, complementando de esta forma el reconocimiento mediado por los TLRs. Los NLRs están formados por un dominio central de unión a nucleótidos (NACHT o NOD; del inglés, “Nucleotide-binding and Oligomerization Domain”) que permite su oligomerización, un dominio

INTRODUCCIÓN

receptor LRRs en el extremo C-terminal implicado en el reconocimiento del ligando y en mantener al NLR en estado inactivo, y un dominio efector en el extremo N-terminal responsable de desencadenar la señalización intracelular ¹⁰².

El dominio N-terminal presente en los NLRs incluye a su vez la interacción de varias proteínas como son los CARD (del inglés, "Caspase Recruitment Domain"), PYD (del inglés, "Pyrin Domain") o BIR (del inglés, "Baculovirus Inhibitor Repeat") ¹²², dando lugar a la clasificación de las diferentes subfamilias: NLRA, NLRB, NLRC, NLRP y NLRX. Los receptores NOD1 o NLRC1 y NOD2 o NLRC2 fueron los primeros NLRs identificados y forman parte de la subfamilia que contiene un dominio CARD en su extremo N-terminal. Ambos receptores reconocen una amplia variedad de componentes microbianos y productos endógenos e inducen la activación de MAPK y NF- κ B, y con ello la transcripción de numerosos genes implicados en la respuesta inmune innata y adaptativa. Por otro lado, algunos receptores como NLRP1 o NLRP3, caracterizados por presentar un dominio PYD en su extremo N-terminal, participan en el ensamblaje de complejos proteicos denominados inflamomas, responsables de la activación de la caspasa-1, proteasa encargada de proteolizar las formas inmaduras de las citocinas clave en la respuesta inflamatoria IL-1 β e IL-18 ¹²³. No obstante, recalcar que existen otros mecanismos alternativos para la activación de estas citocinas, como el mecanismo llevado a cabo por la caspasa-8 ¹²⁴.

El inflamoma NLRP3 es un complejo proteico que actúa como sensor e interviene en el desarrollo de la inflamación, por lo que se ha vinculado con algunas patologías de carácter inflamatorio ¹²⁵. Se trata del inflamoma mejor caracterizado hasta la fecha y puede ser activado en respuesta a una diversidad de factores derivados de patógenos, como LPS o ácidos nucleicos, o frente a moléculas endógenas liberadas en situaciones de estrés como el ATP o el ácido úrico ^{96,126}. La activación del inflamoma se encuentra precedida por la formación de un complejo macromolecular en el que están implicados los tres componentes canónicos: la molécula sensora NLRP3, la proteína adaptadora ASC (del inglés, "Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD") y la molécula efectora procaspasa-1 (Figura 1.9.).

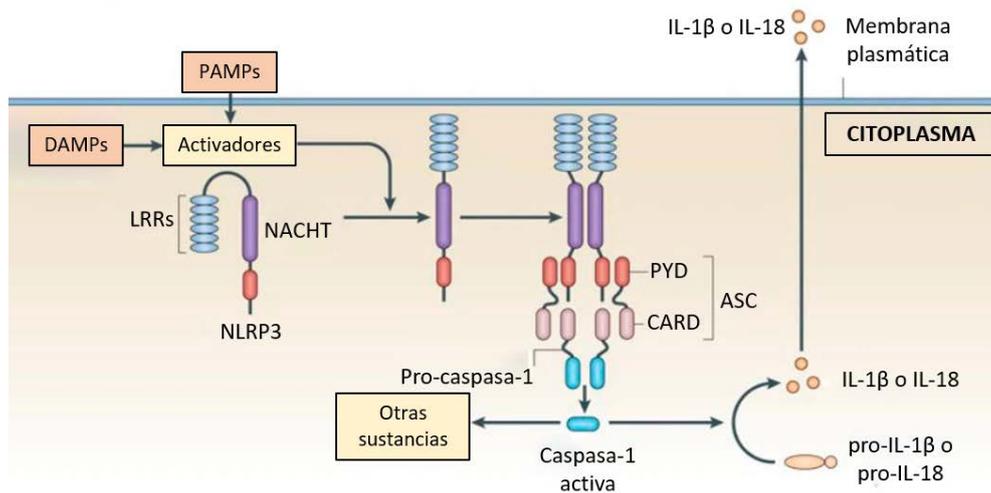


Figura 1.9.- Mecanismo de activación del inflamasoma NLRP3. En condiciones normales, el inflamasoma NLRP3 se encuentra autoreprimido debido a la interacción interna entre el dominio NACHT y las LRRs. En presencia de PAMPs o DAMPs, esta autorepresión se elimina por exposición de NACHT y la oligomerización de NLRP3, que a su vez recluta a las proteínas ASC y pro-caspasa-1, desencadenando la activación de la caspasa-1 y la maduración y secreción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β e IL-18. Adaptación de ¹²⁷.

En la actualidad, se ha propuesto un modelo de dos señales para una activación eficiente del inflamasoma NLRP3, las cuales se suceden a medida que avanza el proceso de señalización. La primera consiste en lo que se conoce como señal pre-estimuladora o *priming*, mediada por la activación de NF- κ B a través de los PRRs en respuesta a ciertos PAMPs o DAMPs. Esta señal inicial da lugar a la sobreexpresión de NLRP3, cuya concentración en condiciones basales es insuficiente para la activación del inflamasoma, y a la expresión de pro-IL-1 β , la cual no se expresa de forma constitutiva en las células ¹²⁸. La segunda señal, específica para el ensamblaje del inflamasoma NLRP3, ocurre en respuesta a una gran diversidad de estímulos y durante la misma tienen lugar una serie de eventos como la alteración de la concentración de iones intracelulares (K^+ y Ca^{2+}) o la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS; del inglés, "Reactive Oxygen Species"), todos ellos interrelacionados para contribuir en el proceso de señalización. Finalmente, la caspasa-1 es responsable de la maduración de pro-IL-1 β y pro-IL-18, obteniendo así las formas biológicamente activas de ambas citocinas proinflamatorias.

1.2.3. Células y mediadores contributivos en el proceso inflamatorio

La respuesta inflamatoria implica una gran variedad de células inmunológicas y no inmunológicas, que actúan de forma interrelacionada con una amplia variedad de mediadores químicos para controlar y mantener la homeostasis del individuo (Figura 1.10.).

INTRODUCCIÓN

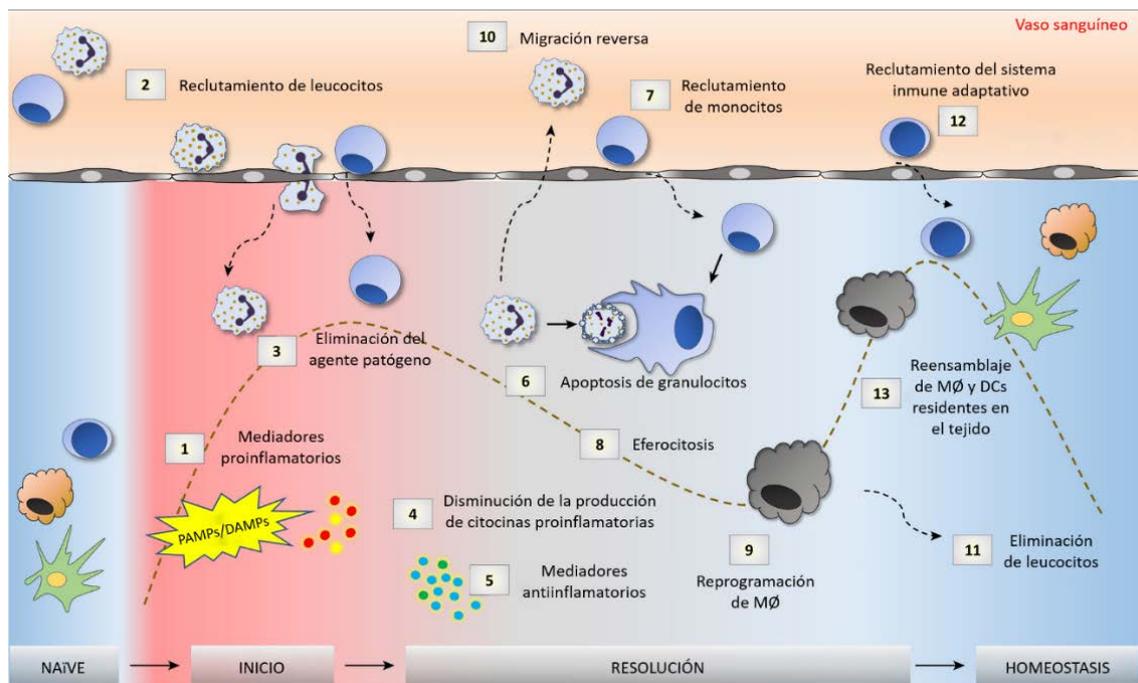


Figura 1.10.- Coordinación de eventos durante la respuesta inflamatoria. (1) Activación de las células residentes del propio tejido que conlleva la iniciación de una cascada de señalización mediante la liberación de mediadores proinflamatorios solubles. (2) Junto con los cambios vasculares, también se produce un aumento de las CAMs por parte de los leucocitos y las células endoteliales circulantes, dando lugar a la exudación de líquido y proteínas y a la entrada de granulocitos y monocitos/MØ desde la sangre al tejido afectado. (3) La función básica del reclutamiento de leucocitos es fagocitar y, por lo tanto, eliminar microorganismos y debris celulares. (4/5) La resolución de la inflamación se caracteriza por la eliminación del infiltrado inflamatorio. La disminución de citocinas proinflamatorias ayuda a limitar la extravasación de células desde la sangre. (6) Apoptosis de PMNs. (7) Reclutamiento de un mayor número de células fagocíticas. (8) Eferocitosis. (9) Eliminación de las células disfuncionales del tejido y reprogramación de los MØ tisulares. (10/11) Las células no apoptóticas abandonan el lugar de la inflamación por medio de la extravasación inversa o la migración vía linfática. (12/13) El tejido es repoblado por diversidad de células inmunes que recuperan el estado de homeostasis. Adaptación de ¹²⁹.

1.2.3.1. Células inmunes innatas implicadas en la respuesta inflamatoria

La extravasación selectiva de células al lugar de la lesión, así como la activación del sistema inmune innato y por consiguiente, del sistema inmune adaptativo, permiten la destrucción de elementos extraños mediante “factores de muerte” y la reparación del tejido dañado a través de “factores de crecimiento” de forma simultánea, lo que se conoce como el yin y yang de la inflamación ¹³⁰. Algunas de las células que participan en este proceso son:

Células polimorfonucleares

Los neutrófilos o PMNs (del inglés, “Polymorphonuclear Neutrophils”) forman parte de la familia de células polimorfonucleares junto con basófilos y eosinófilos, siendo estos los más

abundantes en sangre. Representan en torno a un 50-70% de los leucocitos circulantes en humanos y un 10-25% en ratón ¹³¹, desempeñan un papel clave en la inmunidad innata siendo la principal línea de defensa del organismo frente a patógenos extracelulares, y tal y como se describió ¹³², son junto a los MØ, las células fagocíticas por excelencia.

Durante el inicio de la inflamación, son unas de las primeras células migrantes hacia el lugar de la lesión, mediante un proceso denominado quimiotaxis. Una vez allí, los PMNs fagocitan o destruyen microorganismos invasores y células aberrantes gracias principalmente al contenido de sus gránulos ¹³³. También son capaces de llevar a cabo un tipo especial de muerte programada con función defensiva, la NETosis, que elimina los patógenos mediante la producción de estructuras extracelulares compuestas de ADN y proteínas antimicrobianas, conformando las denominadas trampas extracelulares de PMNs (NETs; del inglés, “Neutrophil Extracellular Traps”) ¹³⁴. Asimismo, los PMNs sintetizan y secretan una amplia variedad de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento y otros mediadores de una manera estímulo dependiente, con lo que promueven la atracción de otras células inmunes como monocitos y DCs e influyen sobre la activación y diferenciación de APCs ¹³⁵⁻¹³⁷; así como de células T y B, contribuyendo a la activación, orientación y expresión de la respuesta inmune adaptativa ¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Por otro lado, aunque los PMNs son componentes clave de la respuesta inflamatoria, tras un periodo corto de tiempo y de actividad vigorosa, la infiltración de PMNs cesa, permitiendo que la inflamación desaparezca y limitando así el daño generado. Algunos estudios han demostrado que mediante la liberación de determinados mediadores antiinflamatorios, los PMNs también son capaces de restaurar la lesión ocasionada contribuyendo a la homeostasis ¹⁴¹⁻¹⁴³.

Monocitos

Los monocitos son leucocitos de gran tamaño equipados con múltiples receptores de reconocimiento para el desarrollo de una respuesta rápida, con capacidad de producir grandes cantidades de moléculas efectoras que intervienen en la defensa contra patógenos ¹⁴⁴. Se trata de células que circulan por el torrente sanguíneo y que, junto con los PMNs, penetran en el tejido inflamado, aunque a diferencia de estos, su acumulación es un proceso mucho más lento puesto que el número de monocitos en circulación es bastante más bajo. Asimismo, también se localizan en medula ósea, donde son producidos, y en bazo, desde donde pueden ser movilizados según las necesidades ¹⁴⁵.

INTRODUCCIÓN

Los monocitos son considerados como centinelas del sistema inmune innato capaces de fagocitar y presentar antígenos contribuyendo con la respuesta adaptativa, y entre sus características más relevantes destacan su heterogeneidad y plasticidad¹⁴⁶, lo que da lugar principalmente a dos subpoblaciones con variación en la expresión de moléculas de superficie: monocitos “clásicos” con una expresión CD14^{high}CD16⁻ en humanos y Ly6C^{high} en ratón, y monocitos “no clásicos” CD14^{low}CD16^{high} en humanos y Ly6C^{low} en ratón¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Entre ellas encontramos diferencias de tamaño, morfología, granularidad y especialmente en su funcionalidad^{150,151}. Además, también es importante destacar la disimilitud que presentan en la expresión de receptores de quimiocinas, los monocitos “clásicos” expresan CCR2^{high}CX3CR1^{low} mientras que los “no clásicos” son CCR2^{low}CX3CR1^{high}^{148,152,153}, lo que les confiere diferencias en la migración y una susceptibilidad diferencial frente a ciertas patologías o infecciones.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶

Durante la inflamación, los monocitos “clásicos” son rápidamente reclutados al lugar de la lesión, donde después de la extravasación, pueden diferenciarse en MØ o DCs tisulares, contribuyendo así a la renovación de las mismas¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

Macrófagos

Los MØ son células diferenciadas que residen en los tejidos y forman parte, junto con los monocitos, del sistema fagocitario mononuclear, componente clave de la inmunidad innata^{160,161}. Aunque la mayoría de los MØ derivan de los monocitos circulantes, se ha descrito que también son capaces de proliferar localmente en estado basal o en respuesta a daños específicos del tejido, siendo por lo tanto capaces de autorrenovarse^{146,162-164}.

En condiciones normales, estas células mantienen la homeostasis y la integridad de los tejidos gracias a su gran capacidad para fagocitar y degradar microorganismos o toxinas, así como células muertas y restos celulares que reconocen debido a la expresión de una gran variedad de receptores de superficie^{165,166}. Además de esta función, los MØ presentan un metabolismo muy activo, por lo que, durante la respuesta inflamatoria son capaces de secretar gran cantidad de moléculas como enzimas proteolíticas y/o bactericidas, quimiocinas, citocinas o factores de crecimiento entre otras, para atraer a otras células y actuar como APCs frente a linfocitos T previamente activados, controlando de esta forma la respuesta inmune adaptativa¹⁴⁴.

La activación de los MØ se produce de dos maneras distintas. La activación “clásica” que conduce a un fenotipo proinflamatorio o M1, y la activación “alternativa” con un fenotipo

antiinflamatorio o M2 (Figura 1.11.). Destacar que esta clasificación de la activación M1/M2 es quizás demasiado dicotómica, es decir se trata de una forma simplificada de denotar la elevada plasticidad de estas células, ya que la polarización de los MØ se trata de un “continuo” en respuesta a una variedad de estímulos en el entorno en el que se localizan ^{146,167}.

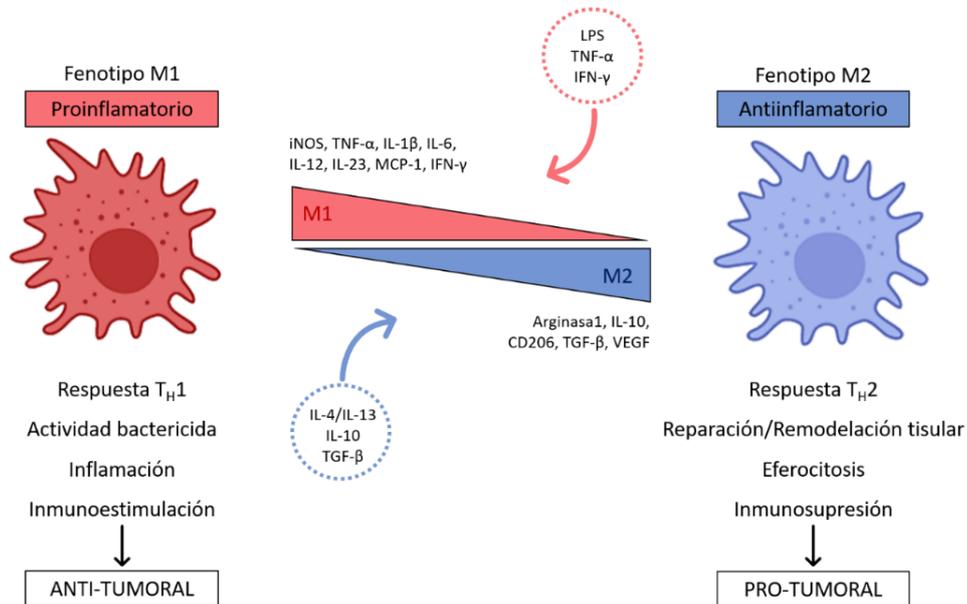


Figura 1.11.- Polarización de macrófagos M1 y M2. LPS, TNF-α e IFN-γ son los mayores estimulantes de la polarización M1 o proinflamatoria, mientras IL-4, IL-13, IL-10 y TGF-β son inductores de la polarización M2 o antiinflamatoria. Dependiendo del fenotipo adquirido, los MØ producen diversidad de citocinas, quimiocinas y otras moléculas específicas que les permiten ejercer diferentes funciones. Adaptación de ¹⁶⁸.

Los MØM1 se activan cuando se exponen a moléculas relacionadas con microorganismos infecciosos y/o citocinas relacionadas con inflamación como TNF-α y/o IFN-γ. Este tipo de MØ se caracteriza por la expresión de iNOS (del inglés, “inducible Nitric Oxide Synthase”) y la producción de moléculas como ROS y óxido nítrico (NO; del inglés, “Nitric Oxide”), además de una gran variedad de citocinas proinflamatorias como TNF-α, IL-1β e IL-6, promoviendo una respuesta TH1. De esta manera, los MØM1 participan en respuestas microbicidas y en inmunidad antitumoral ^{146,169–172}.

Mientras, los MØM2 responden ante citocinas relacionadas con una respuesta TH2 (IL-4 e IL-13) y moléculas antiinflamatorias como IL-10, TGF-β o glucocorticoides. De hecho, en función del estímulo con que estos MØ se activan, junto con otras diferencias funcionales, se pueden dividir en subpoblaciones. Los MØM2 están implicados en la contención de parásitos, regulación de la inflamación, reparación del tejido y proliferación tumoral, mediante la expresión de

INTRODUCCIÓN

arginasa-1 (Arg-1), antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra; del inglés, “Interleukin-1 Receptor antagonist”), y la producción de grandes cantidades de mediadores como IL-10 o TGF- β ¹⁷³⁻¹⁷⁸.

Células dendríticas

Las DCs, cuyo nombre se debe a sus abundantes ramificaciones, son células especializadas en la captación, procesamiento, transporte y presentación antigénica en el contexto de moléculas MHC de clase II, siendo consideradas como las APCs más efectivas, encargadas tanto del inicio de la respuesta inmune como de la tolerancia central y periférica ^{179,180}.

Se trata de una población celular con alta heterogeneidad en cuanto a fenotipo, localización y funcionalidad, pudiendo clasificarse como DCs plasmoides (pDCs) y DCs mieloides o convencionales (cDCs). Las pDCs, presentes en la médula ósea y en los tejidos periféricos, se encargan de producir grandes cantidades de IFN tipo I en respuesta a infecciones virales ¹⁸¹⁻¹⁸³, mientras que las cDCs, presentes en casi todos los tejidos, se encargan de activar linfocitos T *naïve* constituyendo un nexo de unión fundamental entre inmunidad innata y adaptativa ^{184,185}.

En su etapa inmadura, las DCs tienen gran capacidad fagocítica y residen en los tejidos periféricos, donde actúan como centinelas. Seguidamente a la captación de antígenos vía PRRs, las DCs son activadas y migran hacia los órganos linfoides secundarios, donde se convierten en DCs maduras. Durante el proceso de maduración, estas células experimentan un incremento en la expresión de moléculas MHC y moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 y CD86, implicadas en la interacción y activación de linfocitos T, así como en la secreción de citocinas proinflamatorias ^{186,187}.

Células NK

Las células NK son células de estirpe linfoide, pertenecientes a la familia de ILCs ¹⁸⁸, que se encuadran dentro de la inmunidad innata ya que carecen de receptores específicos de antígeno ¹⁸⁹. Fueron descritas por primera vez en 1970 por su capacidad citotóxica frente a varios tipos de células tumorales ^{190,191}. Sin embargo, en la actualidad se conoce que estas células no solo destruyen células neoplásicas o malignas, sino que contribuyen en el control de patógenos intracelulares y mantienen la homeostasis mediante la destrucción de una gran diversidad de células inmunes ¹⁹².

Asimismo, algunos estudios han demostrado como las células NK, en respuesta a diversos estímulos, son capaces de producir diferentes citocinas como IFN- γ , TNF- α o IL-10 entre otras, y quimiocinas como CCL-4 o CXCL8; ejerciendo así actividad reguladora¹⁹³. Mediante la secreción de estos factores solubles y la interacción con otras células inmunes como M \emptyset , DCs o linfocitos T, estas células pueden intervenir en la respuesta inflamatoria y afectar al desarrollo de la inmunidad adaptativa¹⁹⁴⁻¹⁹⁶.

1.2.3.2. Mediadores de la inflamación

Los mediadores de inflamación representan la principal estrategia de comunicación célula a célula. Se trata de moléculas solubles liberadas de manera local por los diferentes tipos celulares que los contienen, o bien como moléculas preformadas dentro de los gránulos secretores (por ejemplo, la histamina), o sintetizadas rápidamente cuando estas son requeridas (por ejemplo, los mediadores lipídicos como son la prostaglandina o los leucotrienos). A este tipo de mediadores se les conoce como endógenos (Tabla 1.3.), mientras que a los productos bacterianos o toxinas se les denomina mediadores exógenos.

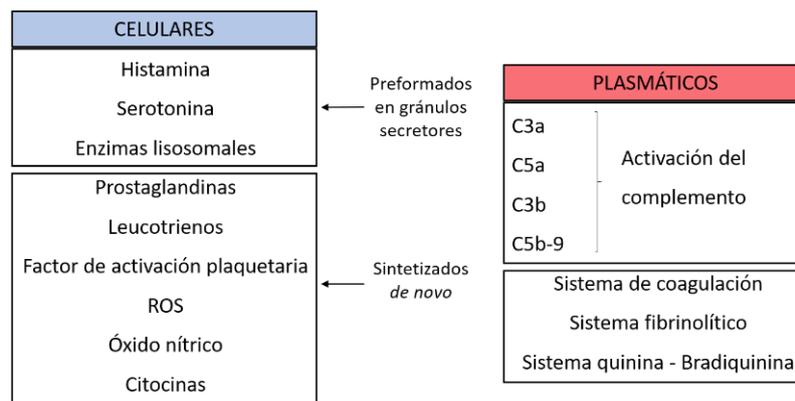


Tabla 1.3.- Principales mediadores en inflamación. Diferentes mediadores endógenos son liberados durante la inflamación aguda y crónica, derivados de células o del plasma. Adaptación de¹⁹⁷.

Citocinas pro- y antiinflamatorias

Las citocinas son proteínas “mensajeras” de bajo peso molecular, por lo general menos de 30 kDa, secretadas como mediadores celulares en respuesta a patógenos, a sus productos u otras señales relacionadas. Tanto las células inmunes (granulocitos, M \emptyset , ILCs, DCs, linfocitos, etc.) como las células no inmunes (células epiteliales, endoteliales, estromales, fibroblastos, adipocitos, etc.) son capaces de producirlas.

INTRODUCCIÓN

Una vez sintetizadas, las citocinas son secretadas al medio extracelular donde se involucran en los procesos de inmunidad innata y adaptativa, regulando la amplitud y duración de la respuesta, por lo que representan una posible solución terapéutica en el tratamiento de ciertas enfermedades ¹⁹⁸. Entre su amplia variedad de funciones encontramos: activación o inhibición, proliferación, diferenciación, maduración, o incluso en algunos casos ejercen funciones efectoras ¹⁹⁹. Las citocinas son moléculas pleiotrópicas, es decir, la misma citocina puede ejercer múltiples efectos en diferentes tipos celulares, y redundantes, es decir, diversas citocinas pueden producir el mismo efecto. Además, pueden ser sinérgicas o antagónicas, de modo que dos citocinas distintas en ocasiones pueden potenciarse mutuamente o bien la acción de una citocina puede bloquear la acción de la otra.

Su unión a los receptores específicos de membrana presenta elevada afinidad, por lo que hacen falta cantidades muy pequeñas de citocinas para desencadenar una cascada de señales de transducción que dé lugar a una alteración del patrón de expresión génica sobre la célula diana, produciendo de este modo una respuesta biológica, la cual puede ser autocrina, paracrina o endocrina.

A pesar de que hasta el momento se han descrito multitud de citocinas, en la Tabla 1.4. se muestran únicamente aquellas que representan una mayor implicación durante la respuesta inflamatoria, pudiendo clasificarlas en dos grupos bien diferenciados en base a su funcionalidad: citocinas pro- y antiinflamatorias ²⁰⁰.

CITOCINA	PRINCIPALES CÉLULAS SECRETORAS	FUNCIONES MAYORITARIAS
<u>PROINFLAMATORIAS</u>		
IL-1 α / IL-1 β	Mon, M \emptyset , PMNs,	Inducción de proteínas proinflamatorias
	Linf, Quer, Fibr	Hematopoyesis
IL-6	Mon, M \emptyset , Gran, Eos, Mas, Células T y B, End, Quer, Fibr,	Diferenciación de células T _H 17
		Inducción de proteínas de fase aguda en hepatocitos
		Tráfico y activación de leucocitos
		Diferenciación, activación y supervivencia de células T

INTRODUCCIÓN

		Diferenciación de células B y producción de IgG, IgM e IgA
		Hematopoyesis
		Neoangiogénesis
IL-8	Mon, MØ, PMNs, Linf, End, Epit, Quer, Fibr	Quemotaxis para PMNs, células NK, células T, basófilos y eosinófilos
		Angiogénesis
IL-17A	PMNs, NK, NKT, T C8+, T $\gamma\delta$, T _H 17	Inducción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y metaloproteasas
		Reclutamiento y activación de PMNs
		Defensa del huésped
TNF- α	Mon, MØ activados, NK, Mas, T CD4+, B, End, Fibr	Mediador proinflamatorio de inicio de respuesta
		Mediador inmunosupresor por limitación del alcance y duración del proceso inflamatorio, y por inhibición del desarrollo de enfermedades autoinmunes y carcinogénesis
		Propiedades antivirales
		Promoción de la actividad citotóxica y diferenciación T _H 1
IFN- γ	MØ, NK, NKT, CTLs, B	Sobrerregulación de moléculas MHC de clase I y II
		Inhibición del crecimiento celular
		Efectos pro-apoptóticos y control de la muerte celular inducida por activación
		Inducción de la apoptosis epitelial en piel y mucosa
ANTIINFLAMATORIAS		
		Inducción de la diferenciación T _H 2
IL-4	Bas, Eos, Mas, NKT T _H 2, T $\gamma\delta$	Sobrerregulación de la expresión de moléculas MHC de clase II en células B
		Aumento de moléculas de adhesión

INTRODUCCIÓN

IL-10	Mon, MØ, DCs, Células T y B	Efecto inmunosupresor a través de APCs o efectos directos sobre las subpoblaciones de células T
IL-33	Células necróticas, Nuo y Fibr en respuesta a estrés, Epit	Supresión de IgE e inducción de IgG Inducción de respuesta T _{H2} en mucosas
TGF-β	Diversidad de células: MØ, Eos, Treg, Epit, Fibr...	Balance de efectos pro- y antiinflamatorios, por disminución del crecimiento celular de prácticamente la totalidad de los precursores de células inmunes Regulación de la diferenciación de las subpoblaciones T _H e inducción de células Treg
Inmunotolerancia		

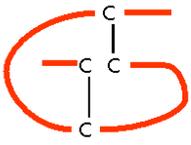
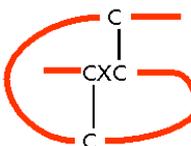
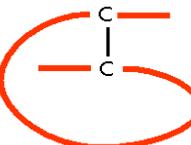
Tabla 1.4.- Principales citocinas pro- y antiinflamatorias implicadas en el proceso inflamatorio. Mon: Monocitos; Linf: Linfocitos; Quer: Queranocitos; Fibr: Fibroblastos; Gran: Granulocito; Eos: Eosinófilo; Mas: Mastocito; End: Célula endotelial; Epit: Célula epitelial; Bas: Basófilo; Nuo: Nuocito. Adaptación de ²⁰¹.

Quimiocinas

Las citocinas con actividad quimiotáctica se denominan quimiocinas y juegan un papel fundamental en la migración y en el tráfico de células inmunológicas durante la respuesta inflamatoria, mediante la creación de gradientes químicos que proporcionan señales a las células a medida que avanzan hacia el tejido. Además de esta función, también están implicadas en otros muchos procesos como el desarrollo de órganos linfoides, diferenciación de células inmunes, embriogénesis o angiogénesis entre otros ^{202,203}.

La estructura del monómero de quimiocina está compuesta por varias regiones, siendo el extremo N-terminal el responsable de la activación de los receptores, y es estabilizada a través de puentes disulfuro. Según la posición de los dos primeros residuos de cisteína (C) próximos al N-terminal, adyacentes o separados por algún aminoácido (X), las quimiocinas pueden clasificarse en cuatro subfamilias: CC, CXC, CX3C y XC; siendo las dos primeras las más estudiadas hasta la fecha ²⁰⁴. Las quimiocinas CC actúan en varios subconjuntos de leucocitos, incluyendo monocitos, eosinófilos, DCs, linfocitos y células NK, pero no en PMNs, mientras que las quimiocinas CXC están implicadas en el reclutamiento de PMNs y otros leucocitos, así como en angiogénesis ²⁰⁵⁻²⁰⁷.

Para que las células respondan frente a una quimiocina, deben de expresar el receptor específico complementario a la misma ²⁰⁸. La existencia de una gran diversidad de receptores de quimiocinas, los cuales forman una gran subfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR; del inglés, “G Protein-Coupled Receptors), indica un alto grado de especificidad, tal y como se muestra en la Tabla 1.5.

FAMILIA	RECEPTOR	LIGANDO
	CCR1	CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13*, CCL14* ¹ , CCL15* ¹ , CCL16* ¹ , CCL23*
	CCR2	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13*, CCL16* ¹
	CCR3	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13*, CCL15* ¹ , CCL24, CCL26, CCL28 ³
	CCR4	CCL17 ² , CCL22 ²
	CCR5	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL11, CCL14* ¹ , CCL16* ¹
	CCR6	CCL20 ²
	CCR7	CCL19 ¹ , CCL21 ²
	CCR8	CCL1
	CCR9	CCL25 ¹
	CCR10	CCL27 ¹ , CCL28 ³
	CXCR1	CXCL1, CXCL6*, CXCL8*
	CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3*, CXCL5, CXCL6*, CXCL8*,
	CXCR3	CXCL4 ³ , CXCL9, CXCL10, CXCL11
	CXCR4	CXCL12 ¹
	CXCR5	CXCL13 ¹
	CXCR6	CXCL16
	CXCR7	CXCL11, CXCL12
	XCR1	XCL1 ² , XCL2* ²

INTRODUCCIÓN

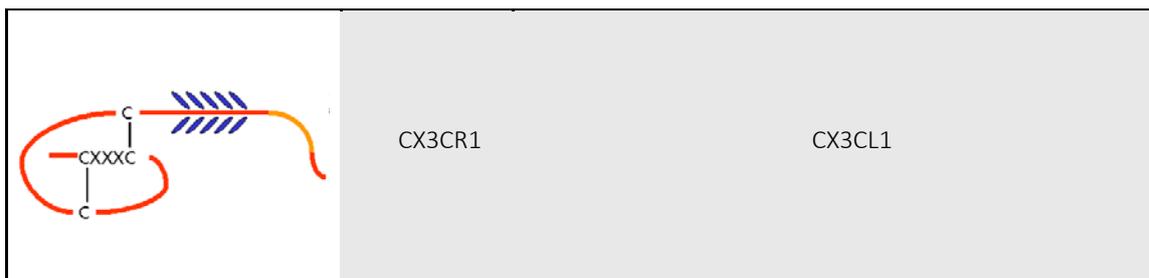


Tabla 1.5.- Superfamilia de las quimiocinas. *En ratón, el ligando adquiere otro nombre o se desconoce su existencia hasta la fecha. Aunque la función principal de la mayoría de las quimiocinas es inflamatoria, encontramos algunas excepciones:¹Homeostática; ²Dual; ³Desconocida. Adaptación de ²⁰⁹.

1.2.4. Granzima A

La gzmA es la proteasa de serina más abundante de los gránulos citotóxicos, cuya especificidad de sustrato viene definida por la estructura de su centro activo (Figura 1.12.), determinando así el corte de las secuencias peptídicas tras residuos de lisina (Lys) y arginina (Arg), por lo que la gzmA presenta actividad triptasa. A diferencia del resto de gzm, actúa como homodímero con un peso molecular de aproximadamente unos 60 kDa ²¹⁰.

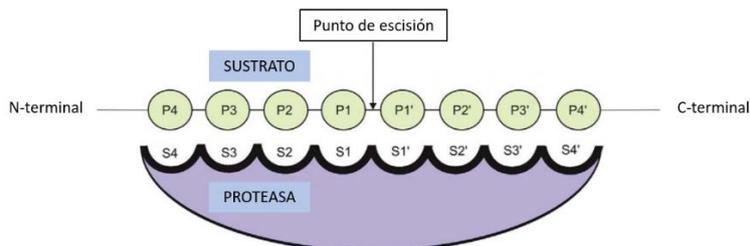


Figura 1.12.- Representación esquemática de la interacción proteasa-sustrato. La figura muestra los subsitios o bolsillos de especificidad del centro activo de la proteasa (S1...Sn y S1'...Sn') acomodando la cadena lateral de los correspondientes residuos del sustrato (P1...Pn y P1'...Pn'). El enlace peptídico entre las posiciones P1-P1' del sustrato corresponde al punto de escisión por acción de la proteasa y se utiliza para establecer la numeración de los residuos tanto de la proteasa como del sustrato. Adaptación de ²¹¹.

A pesar de que algunos estudios han demostrado la capacidad citotóxica de la gzmA utilizando modelos heterólogos *in vitro* ^{212,213}, su capacidad para inducir muerte celular continua siendo motivo de controversia. Sin embargo, durante los últimos años se ha evidenciado la gran relevancia de esta proteasa en los procesos inflamatorios. Se ha visto que tanto la gzmA purificada como las células citotóxicas que expresan gzmA, son capaces de inducir la liberación de IL-1 β , TNF- α e IL-6 en M \emptyset humanos y de ratón ²¹⁴, la producción de IL-6 e IL-8 en fibroblastos o la secreción de IL-8 en células epiteliales ²¹⁵.

En pacientes con determinadas patologías inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide (AR), se observó que los niveles de la gzmA tanto en plasma como en los fluidos sinoviales estaban aumentados²¹⁶. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la gzmA es capaz de inducir osteoclastogénesis por un mecanismo dependiente de TNF- α y, además, utilizando un modelo de artritis inducida por colágeno, se observó que los ratones gzmA^{-/-} mostraban una menor severidad de la enfermedad²¹⁷. De igual forma, utilizando un modelo murino de artritis inducida por Chikungunya, otro grupo observó un incremento de la expresión de la gzmA en las articulaciones y ganglios linfáticos, demostrando así, que los ratones gzmA^{-/-} presentaban una menor severidad en la artritis inducida por el virus²¹⁸.

En pacientes con enfermedades infecciosas provocadas por el virus de Epstein-Barr, el VIH y en pacientes con infecciones parasitarias por *Plasmodium falciparum*, también se detectó un incremento de los niveles de la gzmA en plasma^{219,220}. En el caso de la infección por VIH, la alta concentración de la gzmA podría contribuir a la inhibición de la replicación viral, puesto que se ha descrito que la gzmA es capaz de inactivar retrotranscriptasas virales⁶⁸. Asimismo, pacientes con sepsis bacteriana y con endotoxemia experimental, afección caracterizada por la hipersecreción de citocinas proinflamatorias, presentaron niveles superiores de la gzmA en comparación con pacientes sanos²²¹. En nuestro grupo de investigación, se demostró que la ausencia de la gzmA protegía a los ratones frente a la sepsis bacteriana *in vivo*, sin comprometer el control del patógeno. Esta protección estuvo acompañada por una disminución de la producción de IL-1 α/β , TNF- α e IL-6 en ratones gzmA^{-/-}²²². Aunque ya previamente se había observado una mayor resistencia de estos ratones a la endotoxemia inducida por LPS^{86,214}.

Finalmente, existen evidencias que sugieren que la gzmA podría tener un papel fundamental en la carcinogénesis mediada por inflamación. Pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), los cuales presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (CCR), presentan un incremento de linfocitos infiltrantes con expresión de gzmA²²³. Además, se demostró que el mRNA de la gzmA estaba regulado positivamente en biopsias intestinales de pacientes con colitis ulcerosa (UC; del inglés, "Ulcerative Colitis")²²⁴ y su expresión en subconjuntos específicos de células T CD4⁺ se correlacionaba con la eficacia del anticuerpo monoclonal anti- β 7 integrina Etrolizumab en humanos²²⁵.

INTRODUCCIÓN

1.2.4.1. Otras granzimas con propiedades proinflamatorias

Aunque hasta el momento existen poco estudios al respecto, se ha demostrado la implicación de otras gzm en la respuesta inflamatoria tanto *in vitro* como *in vivo*.

Granzima B

Además de su función citotóxica, la gzmB se ha relacionado con procesos inflamatorios, reparación tisular, coagulación e incluso con funciones antivirales e inmunosupresoras ^{75,83,226}.

La detección de su expresión en células no citotóxicas como MØ, basófilos, mastocitos o células B ^{75,227-229}, así como los niveles aumentados de gzmB en sueros de pacientes con AR ²¹⁶ o en el lavado broncoalveolar de los pacientes con asma ²³⁰, sugiere que esta proteasa podría desempeñar un papel fundamental en la respuesta inflamatoria. Otro estudio realizado en pacientes con endotoxemia inducida por la administración de LPS, demostró la relevancia biológica de la gzmB en la infección al detectar un aumento en los niveles plasmáticos ²²¹.

Granzima K

La gzmK, al igual que la gzmA, es una proteasa de serina con actividad triptasa que ha demostrado tener propiedades proinflamatorias, siendo capaz de inducir la producción de citocinas como IL-1β, IL-6 y TNF-α en diversidad de tipos celulares ^{85,231}. Los niveles elevados de gzmK en el plasma de pacientes con sepsis ²³² o la potenciación de la respuesta frente a LPS en monocitos humanos ²³³, así como su aumento en el fluido broncoalveolar de pacientes con asma o neumonía viral ^{234,235}, involucran a la gzmK en la respuesta inflamatoria.

Granzima M

La gzmM, proteasa que se expresa fundamentalmente en células NK, NKT y linfocitos Tγδ ²³⁶, se ha demostrado que ejerce funciones reguladoras sobre la liberación de determinadas citocinas durante infecciones causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas ⁸⁶. Utilizando modelos de ratón gzmM^{-/-} en comparación con cepas salvajes, se demostró una mayor resistencia a la endotoxemia inducida por LPS, así como un descenso de los niveles de citocinas proinflamatorias, y una mayor supervivencia frente a *Listeria monocytogenes*, lo que señala que la gzmM juega un papel importante en la respuesta inflamatoria frente a infecciones bacterianas

^{86,237,238}. Además, pacientes con UC mostraron altos niveles de expresión de mRNA de gzmM en el colon inflamado ²³⁹.

1.2.4.2. Inhibidores de granzimas: Serpinas

Si bien la proteólisis mediada por las gzm desempeña un papel clave en la respuesta inmunológica, un exceso de su actividad podría derivar en diversos estados fisiopatológicos. Es por ello, por lo que resulta fundamental la existencia de un sistema de regulación de dicha actividad proteolítica. El término SERPIN (del inglés, "Serine Protease Inhibitors"), propuesto por Carrell y Travis en 1985, describe a la superfamilia de proteínas inhibidoras de las proteasas de serina ^{240,241}. Aunque su nombre deriva de su función principal, la mayoría de las serpinas participan en una amplia gama de procesos fisiológicos como la activación del complemento, la cascada de coagulación, la apoptosis o incluso la carcinogénesis, siendo este último uno de los mecanismos utilizados por las células tumorales para escapar a la inmunovigilancia ²⁴²⁻²⁴⁵. Se demostró que los CTLs sintetizan sus propias serpinas, las cuales actúan en el citosol para neutralizar a las gzm y protegerse de sus efectos ^{242,246}.

Las serpinas son glicoproteínas constituidas por una cadena central de aminoácidos y varias cadenas laterales de carbohidratos, que se agrupan en láminas y hélices sosteniendo un bucle de unos 20 residuos de aminoácidos, en el que se sitúa su centro activo. La inhibición comienza cuando la gzm reconoce el centro activo o RCL (del inglés, "Reactive Center Loop") de la serpina, la cual experimenta un cambio conformacional que provoca la formación de un complejo estable covalente con estequiometría 1:1 y bloquea el centro activo de la proteasa, de forma que la inactiva ²⁴⁷⁻²⁴⁹. La combinación del RCL junto con el exosito, lugar de unión secundario alejado del centro activo que aumenta la tasa de asociación en varios ordenes de magnitud, determinan la especificidad de interacción de las diferentes serpinas.

Las serpinas inhibidoras de gzm identificadas hasta el momento son:

- SerpinaC1 (antitrombina III) ²⁵⁰, serpinaE2 (PN-1) ^{251,252}, serpinaB12 ²⁵³ y serpinab6b ²⁵⁴ inhiben a la gzmA.
- SerpinaB9 (PI-9) ^{242,255} y serpina3n (α -antiquimiotripsina) ^{256,257} se han identificado como inhibidores de la gzmB.
- SerpinaB4 suprime la muerte celular mediada por la gzmM ²⁵⁸.

2.1. Nanotecnología

A pesar de que no existe una única definición internacionalmente aceptada, según la *National Nanotechnology Initiative* (NNI), la nanotecnología se define como la parte de la ciencia que comprende las técnicas y herramientas para la creación y utilización de sistemas, estructuras y materiales que tengan al menos una de sus dimensiones en el rango entre 1 y 100 nm. En 2011, la *European Commission Recommendation* sugirió la introducción en la definición de materiales naturales o sintéticos, que contuvieran partículas dispersas, agregados o aglomerados, en el que al menos el 50% de las mismas estuvieran en el rango de tamaño establecido por el NNI ²⁵⁹.

2.1.1. Antecedentes históricos de la nanotecnología

En 1959, el físico Richard Feynman introdujo la posibilidad de trabajar a escala nanométrica en su famoso discurso “There’s plenty of room at the bottom” en la reunión anual de la *American Physical Society* ²⁶⁰. No obstante, no fue hasta la década de los 80, cuando Norio Taniguchi, profesor de la Universidad de Tokio, utilizó por primera vez el término “nanotecnología” ²⁶¹. Con el descubrimiento de técnicas como la microscopía de efecto túnel (STM) ^{262,263} y materiales como los quantum dots ²⁶⁴ o el fullereno ²⁶⁵, la nanotecnología se convirtió en una verdadera revolución.

Sin embargo, los nanomateriales existen desde hace décadas y la humanidad los ha estado utilizando durante siglos sin ser conscientes de ello (Figura 2.1.).

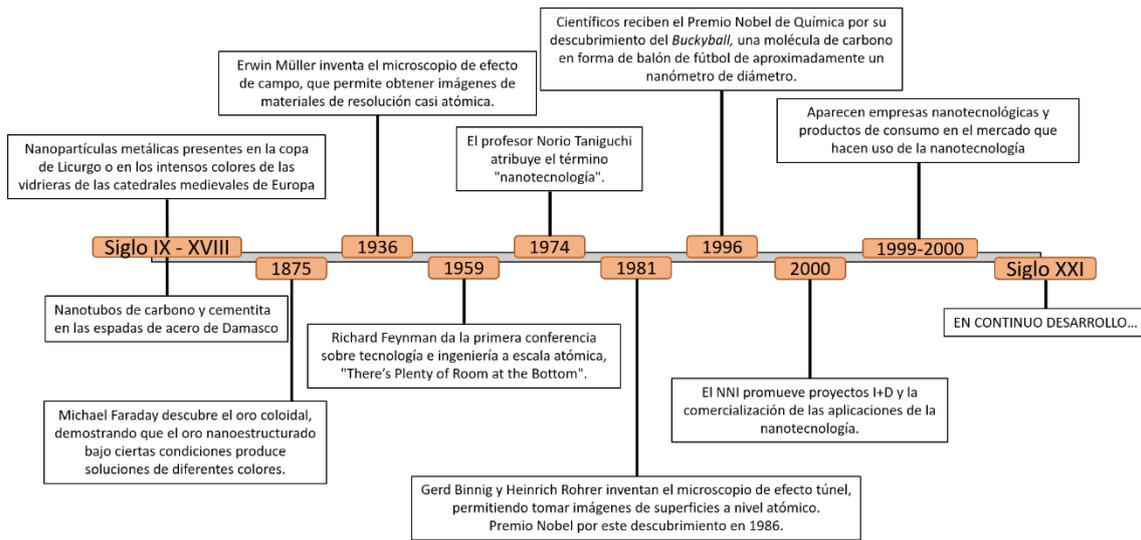


Figura 2.1.- Representación gráfica de los principales avances de la nanotecnología en escala cronológica. Adaptación de la *American Chemistry Council (ACC)*.

2.1.2. Propiedades de los nanomateriales

En la actualidad, y como veremos en apartados posteriores, el tipo de nanomaterial más estudiado y empleado son las nanopartículas (NPs) debido a su gran variabilidad, por lo que de aquí en adelante ambos términos se utilizarán indistintamente.

Las NPs se comportan de manera muy distinta a sus homólogos a nivel macroscópico debido a que sus reducidas dimensiones permiten interacciones entre partículas altamente específicas, conllevando la aparición de nuevas o mejoradas propiedades físicas (ópticas, magnéticas, eléctricas, estructurales, mecánicas, etc) y/o químicas^{266,267}. Tal y como se muestra en la Figura 2.2., los parámetros más influyentes sobre estas propiedades características de cada una de las NPs son el tamaño, la superficie, la forma y la composición química del núcleo.

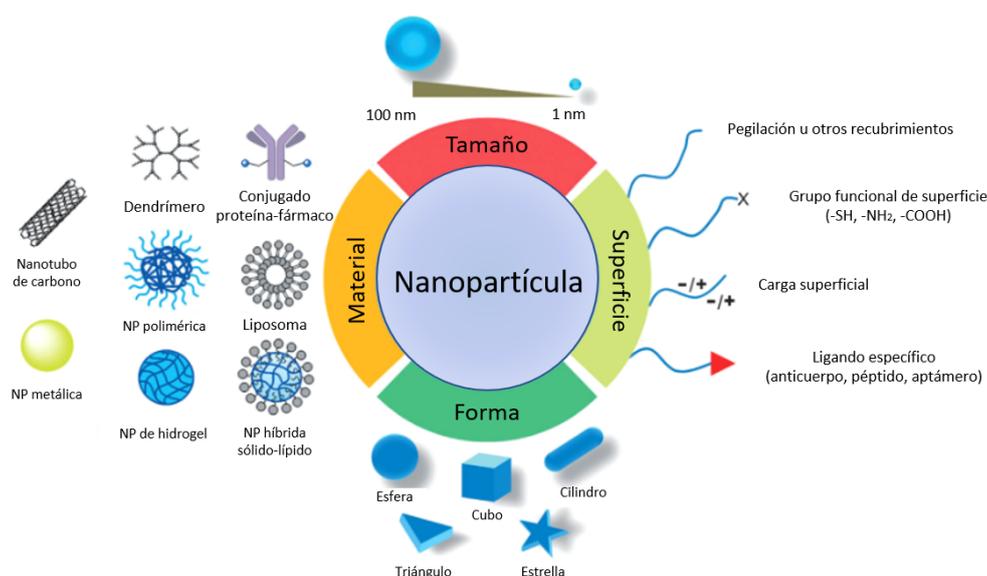


Figura 2.2.- Principales parámetros que influyen sobre las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales. Se muestran las NPs que han sido utilizadas como portadoras para la administración de fármacos en la terapia frente al cáncer, junto con las propiedades fisicoquímicas de las mismas. Adaptación de ²⁶⁸.

Tamaño. Tal y como se ha descrito anteriormente, con una dimensión, al menos, en el rango entre 1 y 100 nm.

Superficie. Permite la funcionalización de las NPs con una amplia variedad de ligandos de naturaleza muy diversa, los cuales pueden ejercer como estabilizantes, modificar la solubilidad en distintos medios o variar la carga neta entre otras ²⁶⁹, siendo esta última el mayor determinante del comportamiento coloidal de las NPs, capaz de modificar forma y tamaño a través de la formación de agregados o aglomerados ^{270,271}. En general, las estrategias seguidas para la funcionalización de ligandos de superficie son similares independientemente del material con que se trabaja, llevándose a cabo mediante la formación de enlaces covalentes, de coordinación o interacciones electrostáticas ²⁷².

Forma. Esferas, prismas, cubos, estrellas o cilindros entre otros ^{273,274}.

Composición química del núcleo. Es uno de los parámetros más influyente sobre las propiedades de las NPs. Podemos encontrar NPs orgánicas compuestas principalmente por átomos de carbono (NPs poliméricas, liposomas, dendrímeros, fullerenos, etc.), NPs inorgánicas (quantum dots, NPs metálicas y/o magnéticas, etc.) o sistemas híbridos, es decir, NPs complejas constituidas por combinación de varios materiales ²⁷⁵.

2.1.3. Aplicaciones de las nanopartículas

Durante los últimos años, gracias a los avances en las técnicas de caracterización a escala nanométrica, un número creciente de productos que contienen o utilizan nanomateriales han sido desarrollados, tanto es así, que se le ha denominado la “Revolución Industrial del siglo XXI” comparable con el impacto de la Revolución Industrial que tuvo lugar entre los años 1760-1840. Por ello, la nanotecnología se ha convertido en un área estratégica altamente competitiva y con un considerable potencial económico en campos tan variados como la biomedicina, la cosmética, los textiles, la informática o la comunicación entre otros (Figura 2.3.)²⁷⁶.

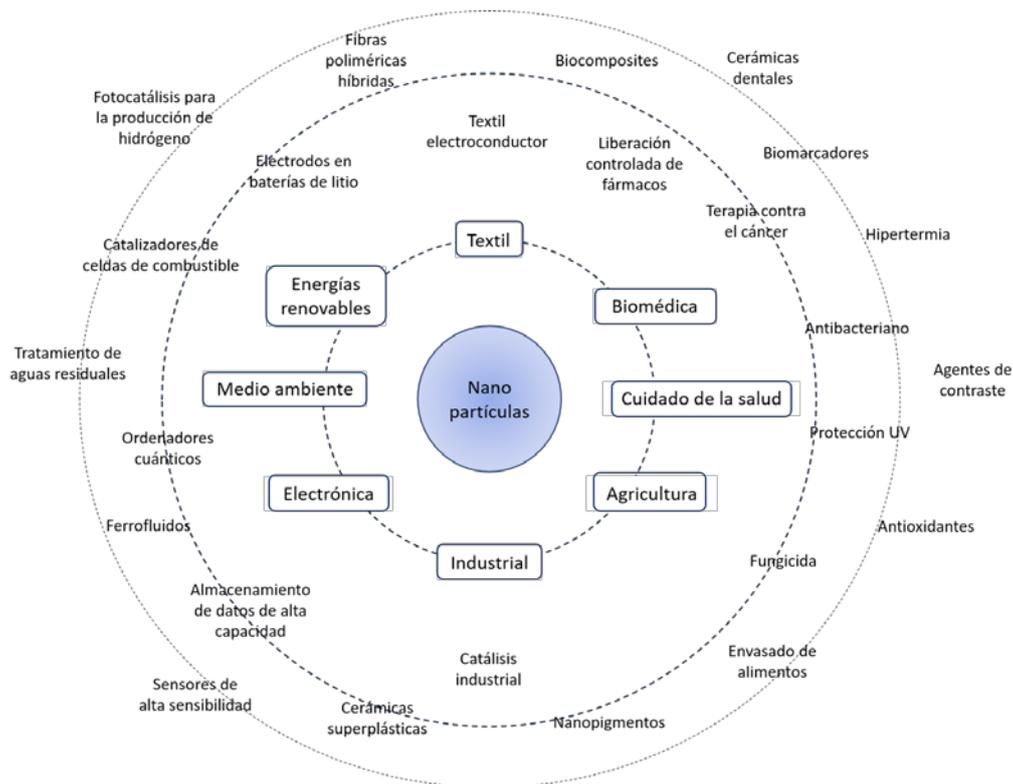


Figura 2.3.- Principales aplicaciones de las NPs. Esta gran variedad de aplicaciones es debida en parte a que, según el método de síntesis utilizado, se pueden llegar a conseguir unas propiedades específicas para una aplicación determinada de las diferentes NPs. Adaptación de ²⁷⁷.

2.2. Nanomedicina

La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología para prevenir, monitorizar, diagnosticar, tratar y/o curar determinadas enfermedades como el cáncer, la diabetes o enfermedades neurodegenerativas entre otras ²⁷⁸. Dado su importancia en la actualidad, el

INTRODUCCIÓN

desarrollo de nuevos nanomateriales con el objetivo de crear, modificar y/o mejorar los sistemas de diagnóstico y los tratamientos terapéuticos ya existentes, se ha establecido como línea prioritaria en los países miembros de la *Organization for Economic Cooperation and Development* (OCDE).

2.2.1. Principales ventajas del uso de bio-nanomateriales

De todas las aplicaciones mencionadas en el Apartado 2.1.3., el mayor porcentaje de productos o aplicaciones que incorporan nanotecnología se agrupan dentro del campo de la salud y el bienestar ^{279,280}, dadas las múltiples ventajas que presentan las NPs.

- Debido al aumento del ratio superficie/volumen, las NPs poseen una mayor superficie de contacto con el entorno, provocando una mayor reactividad ²⁸¹. Este aumento de superficie permite la unión de múltiples ligandos, convirtiendo a estos sistemas en plataformas multifuncionales capaces de detectar de forma temprana determinadas enfermedades ²⁸².
- La obtención de imágenes de contraste de las estructuras anatómicas de los diferentes tejidos, así como su marcaje, permiten diagnosticar, monitorizar la eficacia terapéutica o incluso tratar de manera simultánea ^{283,284}.
- Asimismo, las NPs pueden utilizarse para la encapsulación de diferentes compuestos, pudiendo adaptar su composición, tamaño, forma y propiedades de la superficie, lo que suele dar lugar a una mejora de la solubilidad y una modificación de su farmacocinética y biodistribución en comparación con sus homólogos tradicionales ^{285,286}. De esta forma, también se consigue la vehiculización dirigida de genes o fármacos a tejidos o células específicas, obteniendo una mayor facilidad en la administración y una mejor eficiencia a dosis más bajas, lo cual se traduce directamente en un menor coste y en una disminución de los posibles efectos secundarios nocivos de las biomoléculas administradas.
- Además, las NPs pueden utilizarse como recubrimientos para mejorar la biocompatibilidad de implantes o prótesis ²⁸⁷, como materiales para ingeniería tisular, medicina regenerativa y/o biomiméticos ^{288,289}, como adyuvantes para vacunas o terapias antitumorales ^{290,291}.

2.2.2. Tipos de nanopartículas aplicadas en biomedicina

Hasta la fecha, se han diseñado y estudiado numerosos tipos de NPs tanto orgánicas como inorgánicas para su uso en biomedicina (Figura 2.4.).

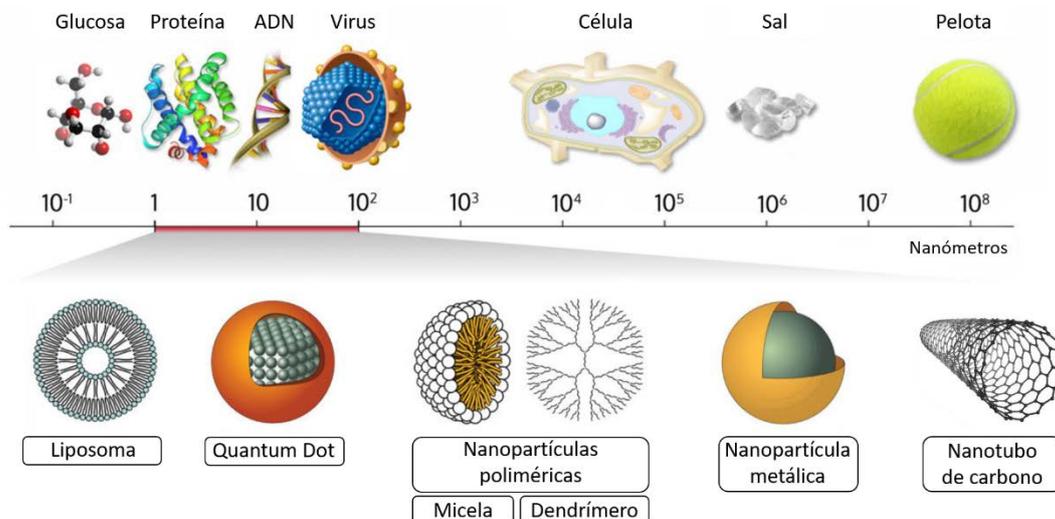


Figura 2.4.- Esquema comparativo de los diferentes tipos de NPs dentro de su rango de escala nanométrica de 1 a 100 nm. El rango de dimensiones en el que se encuadran todas estas NPs hace que sean sistemas ideales para su uso a nivel celular, ya que son capaces de interactuar con casi cualquier biomolécula presente en el organismo. Adaptación de <http://www.wichlab.com/nanometer-scale-comparison-nanoparticle-size-comparison-nanotechnology-chart-ruler-2/>.

2.2.2.1. Liposomas

Los liposomas o vesículas fosfolipídicas, son estructuras esféricas compuestas por una bicapa lipídica que rodea un espacio central acuoso ²⁹². Estos nanomateriales se han utilizado para estudiar el comportamiento de las membranas biológicas debido a sus similitudes en cuanto a estructura, composición y permeabilidad selectiva ²⁹³. Además, su naturaleza anfifílica, junto con su biocompatibilidad, permiten encapsular en su cavidad interna moléculas hidrofílicas con diferentes propiedades fisicoquímicas, convirtiéndose en buenos transportadores de fármacos; así como también permiten la unión de especies hidrófobas a su superficie consiguiendo el direccionamiento activo de los mismos ²⁹⁴⁻²⁹⁶. Sin embargo, el uso de liposomas presenta ciertas limitaciones debido a su baja estabilidad y reproducibilidad entre los distintos lotes ²⁹⁷, la dificultad para su esterilización, los bajos niveles de carga permitidos o su tamaño relativamente grande ²⁹⁸.

INTRODUCCIÓN

2.2.2.2. Quantum Dots

Los Quantum Dots (QD) son partículas esféricas cristalinas semiconductoras cuyo diámetro es de aproximadamente 1-20 nm. Generalmente están compuestos por azufre (S), selenio (Se) y telurio (Te) de zinc (Zn), cadmio (Cd), plomo (Pb) o mercurio (Hg), aunque los más utilizados son los QD de sulfuro de cadmio y seleniuro de cadmio^{284,299}. Sus propiedades implican una amplia banda de absorción desde el UV hasta el visible, alta fotoestabilidad, fuerte resistencia a la degradación por la luz o a diferentes agentes químicos y elevado rendimiento cuántico. Por ello, se han convertido en excelentes agentes de contraste para imagen y notables marcadores en bioensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, pudiendo mejorar la señal hasta 100 veces comparada con proteínas o sondas orgánicas tradicionales marcadas fluorescentemente^{300,301}. Además, si combinamos su capacidad para emitir luz en el espectro IR con la capacidad de dirigirse específicamente a determinadas dianas a través de materiales de recubrimiento, los QD presentan una ventaja para el diagnóstico no invasivo (Wu et al. 2003, Gao et al. 2004, Kim et al. 2004, Michael et al. 2005).

2.2.2.3. Nanopartículas poliméricas

Dependiendo de su composición, dentro de las NPs poliméricas podemos distinguir entre varios tipos de estructuras como por ejemplo, nanoesferas o nanocápsulas (NCs)³⁰²⁻³⁰⁴. Los polímeros que conforman este tipo de NPs pueden ser de diferente naturaleza: sintéticos biodegradables como el ácido poli-(láctico-co-glicólico) (PGLA)³⁰⁵ o no biodegradables tales como polietilenglicol (PEG)³⁰⁶; semisintéticos, como los derivados de la celulosa³⁰⁷; naturales, como son los polisacáridos de ácido hialurónico o quitosano, tal y cómo se describe a continuación en el Apartado 2.2.4.³⁰⁸; o una combinación de ellos. Independientemente del polímero seleccionado, estos siempre deben de ser químicamente inertes, no tóxicos y libres de impurezas lixiviables con el fin de ser utilizados en el campo de la nanomedicina.

A diferencia de los liposomas, las NPs poliméricas presentan mejor control de la liberación de fármacos de diferente naturaleza química, además de ser altamente biocompatibles y poco inmunogénicas. Otra característica importante es que sus productos de degradación pueden ser eliminados por el metabolismo celular, evitando así su acumulación en el organismo y, por lo tanto, posibles efectos adversos.^{309,310} Sin embargo, una de sus principales desventajas radica en su estabilidad durante su almacenamiento³¹¹.

2.2.2.4. Nanopartículas metálicas

Las NPs metálicas son sintetizadas principalmente a base de metal y en función de la composición de su núcleo podemos distinguir entre NPs de oro (Au), plata (Ag), cobre (Cu) o platino (Pt). Dentro de este tipo de NPs también se engloban las NPs de óxidos metálicos, como el Cu, Zn o titanio (Ti), o las NPs magnéticas, como el hierro (Fe), níquel (Ni), cobalto (Co) o manganeso (Mn). De entre todas ellas, podemos destacar:

Nanopartículas metálicas de oro

Las AuNPs presentan importantes propiedades térmicas, eléctricas y ópticas, así como resistencia a la corrosión. Su naturaleza bioinerte y aparente baja toxicidad comparada con otros nanomateriales ^{312,313}, las convierte en un candidato excelente para aplicaciones biomédicas como veremos con más detalle en el Apartado 2.2.3.

Nanopartículas magnéticas

Las NPs magnéticas (MNPs) resultan de especial interés al poder ser manipuladas por un campo magnético externo. Debido a su menor toxicidad, las más utilizadas en aplicaciones biomédicas son aquellas cuyo núcleo se compone de magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Sin embargo, tras su síntesis es necesaria una segunda etapa en la que se añade una cubierta sobre la NP que evita la corrosión de su núcleo magnético, además de aumentar su estabilidad ³¹⁴. Este tipo de NPs pueden utilizarse para el transporte de fármacos guiados por un imán (magnetofección) ³¹⁵, para generar calor tanto en tratamientos de hipertermia como para la liberación de fármacos de manera controlada, o como agentes de contraste ³¹⁶.

2.2.2.5. Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono son moléculas cilíndricas constituidas por una o más láminas de carbono enrolladas sobre sí mismas, pertenecientes a la familia de los fullerenos ³¹⁷. Sus diámetros y longitudes pueden ser muy variables y su geometría hace que presenten propiedades únicas: alta conductividad eléctrica y térmica, así como elevados valores de resistencia entre otras ³¹⁸. Estas estructuras se han utilizado como sensores para detectar ADN y proteínas, como dispositivos de diagnóstico o nanosistemas de transporte de moléculas ^{319,320}. Sin embargo, los nanotubos de carbono muestran limitaciones tales como su alta hidrofobicidad e inercia química,

INTRODUCCIÓN

requiriendo su modificación química previa a su uso, o la heterogeneidad incluso dentro del mismo lote en cuanto a su tamaño, y por lo tanto en el número de capas que los conforman.

2.2.3. Nanopartículas metálicas de oro

2.2.3.1. Propiedades ópticas de las AuNPs

Las AuNPs presentan unas excelentes propiedades ópticas influenciadas por un fenómeno comúnmente conocido como resonancia de plasmón superficial (SPR; del inglés, “Surface Plasmon Resonance”). Básicamente, las partículas tienen la capacidad de absorber determinadas frecuencias de luz incidente y transmitir frecuencias no absorbidas debido a una excitación colectiva de electrones libres de la banda de conducción, produciéndose una vibración de la nube electrónica para disipar dicha energía³²¹. Este fenómeno se origina cuando el tamaño de las NPs es mucho menor que la longitud de onda de la radiación incidente $d \ll \lambda$, y puede ocurrir en cualquier nanomaterial con una densidad adecuadamente alta de electrones libres. En el caso de las AuNPs, en las que la resonancia es máxima, este efecto es el responsable de la variación de la posición de banda del plasmón superficial respecto al tamaño, lo que se traduce en un cambio de color de las NPs en solución, descrito por primera vez en 1857 por Michael Faraday^{322,323}.

Otros parámetros como forma, estructura y morfología, así como cambios en el entorno que rodea a las NPs (índice de refracción en la disolución, etc.), también influyen sobre el comportamiento de las mismas³²⁴.

2.2.3.2. Síntesis, funcionalización y caracterización de las AuNPs

Además de describir las propiedades del oro coloidal, Michael Faraday publicó un estudio acerca de la preparación de “partículas finas”. Sin embargo, no fue hasta 1951 cuando Turkevich describió la reducción de una sal de oro utilizando ácido tetracloroáurico ($H[AuCl_4]$) como precursor, y citrato trisódico (Na_3Ct) como agente reductor en solución acuosa, un método relativamente sencillo de obtener AuNPs, donde el Au^{3+} se reduce a Au^0 y forma el núcleo para el crecimiento de las mismas³²⁵. Posteriormente, este método fue mejorado por Frens³²⁶, proporcionando alta reproducibilidad y monodispersidad hasta diámetros de 50 nm aproximadamente, y en él, el Na_3Ct se utiliza tanto como reductor de la sal de oro, como agente estabilizante de las propias NPs impidiendo así su aglomeración.

En la actualidad, existen una gran variedad de métodos de síntesis de AuNPs que pueden agruparse en métodos físicos o químicos, siendo estos últimos los más utilizados. A su vez, la síntesis puede efectuarse a través de dos mecanismos conocidos como “top-down – técnica descendente” o “bottom-up – técnica ascendente”. El primer procedimiento se inicia a partir de un material macroscópico para ir reduciéndolo hasta niveles nanométricos, mientras el segundo consiste en la unión de átomos y moléculas para la generación de un conglomerado de tamaño nanométrico. Mientras la estrategia “top-down” da lugar a una mayor cantidad de impurezas y un menor control de las características de las NPs generadas, la estrategia “bottom-up” (Figura 2.5.) permite una mayor monodispersidad y mayor variedad de tamaños y formas de modo controlado, resultando así las más común y efectiva ^{327,328}.

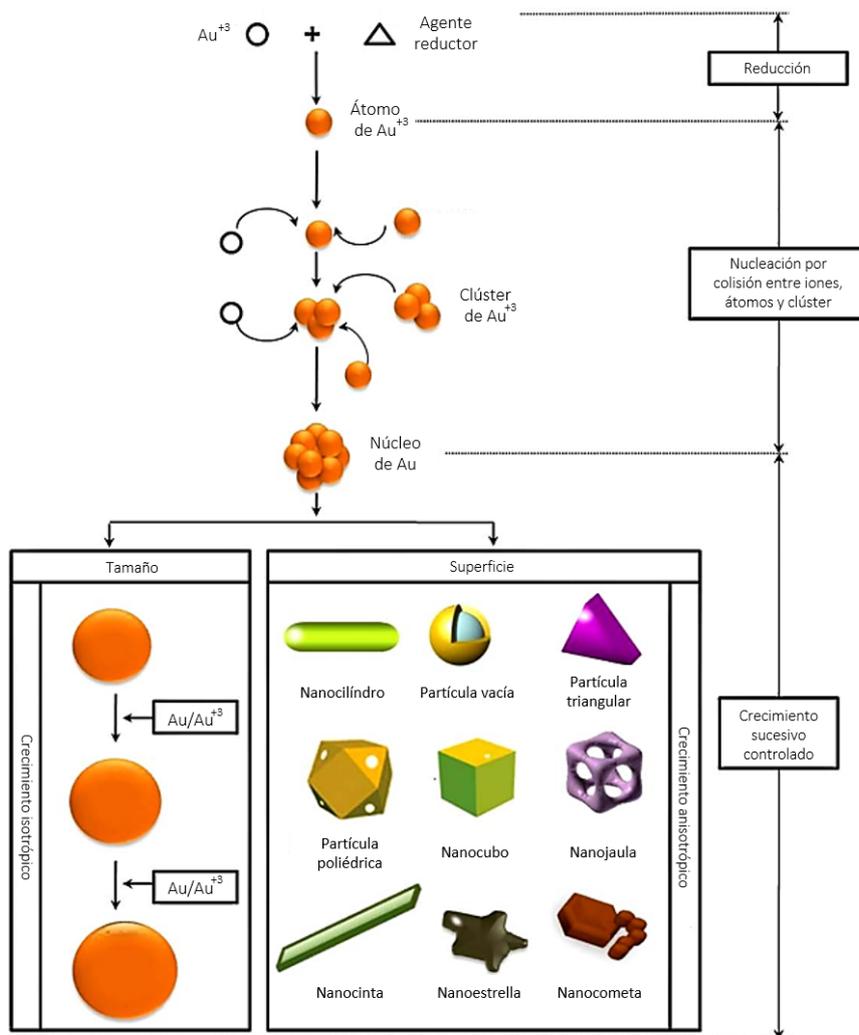


Figura 2.5.- Esquema de síntesis de las AuNPs mediante reducción química por estrategia “bottom-up”. La formación de las AuNPs por reducción de sal de oro puede dar lugar a diferentes tamaños y formas. Adaptación de ³²⁹.

INTRODUCCIÓN

Tras la síntesis, las AuNPs se purifican mediante centrifugación o diálisis y se recubren o PEGilan con el objetivo de aumentar su estabilidad en solución acuosa. Para ello, es frecuente el uso de cadenas de PEG debidamente derivatizadas con un grupo tiol para su unión covalente al núcleo de oro, y con grupos funcionales de diferente naturaleza (grupos amonio cuaternario, amino primario o carboxilo) para modular su carga superficial y facilitar su posterior funcionalización con otros ligandos de interés que introduzcan diversas funcionalidades y propiedades al sistema. Asimismo, el PEG tiene la capacidad de aumentar la biocompatibilidad de las NPs ^{330,331}, impidiendo la opsonización de las mismas por proteínas del suero o su fagocitosis mediada por células fagocíticas (Figura 2.6.), reduciendo la respuesta inmunitaria y, consecuentemente, aumentando su tiempo de vida media en el torrente sanguíneo ^{313,332}.

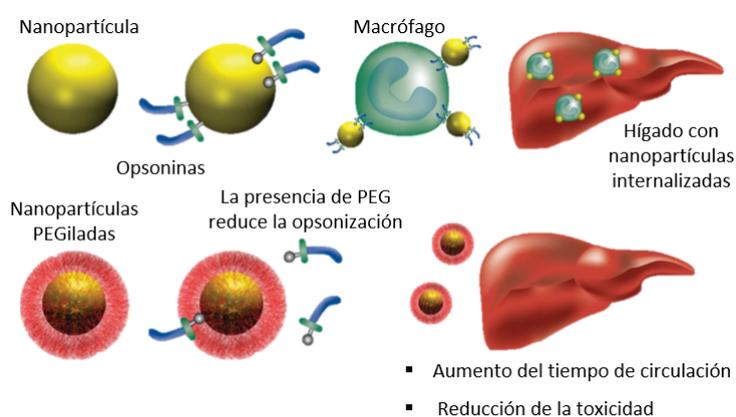


Figura 2.6.- El PEG previene la absorción de las NPs por el sistema reticuloendotelial. En ausencia de PEG, se observa como las NPs son recubiertas por opsoninas, las cuales facilitan la fagocitosis mediada por los MØ y su posterior eliminación a través del hígado. Mientras, las NPs recubiertas con PEG evitan esta opsonización, disminuyendo su acumulación en el hígado y, por lo tanto, aumentando su tiempo de vida media en el torrente sanguíneo. Adaptación de ³³³.

Finalmente, la caracterización de las AuNPs se realiza mediante diferentes técnicas en base a sus propiedades fisicoquímicas, siendo algunas de ellas: microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM) o microscopía de fuerza atómica (AFM) para analizar el tamaño y la morfología; dispersión de luz dinámica (DLS) para estimar su diámetro hidrodinámico; potencial Zeta (ζ) para la estabilidad de su dispersión; espectroscopía infrarroja (FTIR) o Raman para el análisis estructural; o espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) para sus propiedades ópticas ³³⁴.

2.2.3.3. Aplicaciones de las AuNPs en biomedicina

El oro elemental y los compuestos de oro fueron venerados y utilizados por los médicos de diversidad de civilizaciones para tratar variedad de patologías. Ya en el siglo XX, Jacques Forestier propuso la utilización de compuestos de oro inyectables para el tratamiento de la AR³³⁵. El experimento clínico inicial y aparentemente exitoso fue el que llevó a los investigadores durante los siguientes años a investigar los efectos tanto beneficiosos como tóxicos de los antiartríticos complejos de oro³³⁶. Asimismo, se utilizaron otros fármacos cuyas formulaciones contenían oro para el tratamiento o la detección de algunos trastornos mentales o enfermedades infecciosas entre otros^{337,338}. Desde entonces, y con los avances realizados dentro del campo de la nanomedicina, se han desarrollado AuNPs para su aplicación en terapia fototérmica³³⁹, diagnóstico³⁴⁰⁻³⁴², liberación de fármacos^{343,344}, imagen molecular³⁴⁵, transferencia génica³⁴⁶ o desarrollo de biosensores^{321,347} (Figura 2.7.).

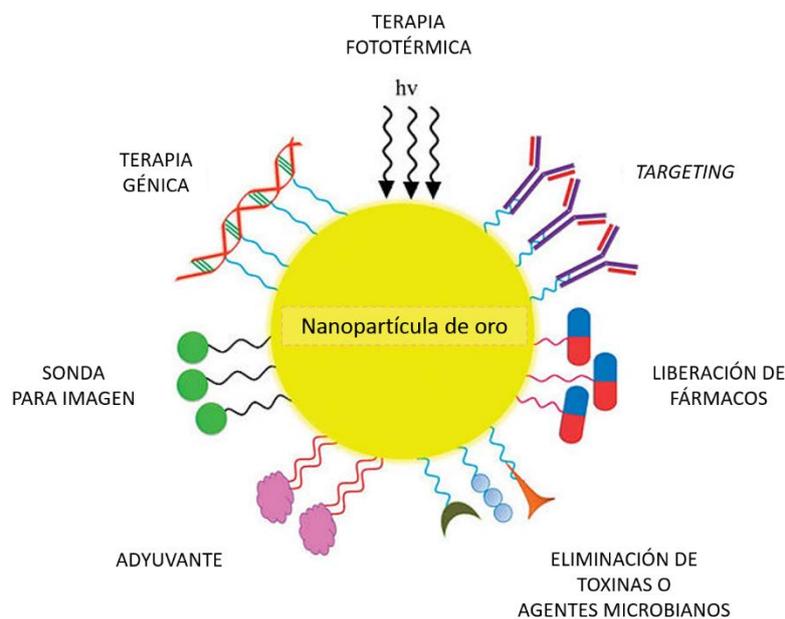


Figura 2.7.- Aplicaciones de las AuNPs en diagnóstico y terapia. Este tipo de NPs son utilizadas en una amplia variedad de contextos como son: terapia fototérmica, *targeting*, liberación de fármacos, imagen, liberación de ácidos nucleicos, eliminación de toxinas y agentes microbianos y como adyuvante. Adaptación de³⁴⁸.

2.2.4. Nanocápsulas de quitosano

2.2.4.1. Propiedades del quitosano

El quitosano es un biopolímero catiónico hidrosoluble derivado de la desacetilación parcial de la quitina, procedente del exoesqueleto de crustáceos, insectos, hongos, levaduras y moluscos³⁴⁹. Su grado de desacetilación, junto con su peso molecular, son dos factores clave en la determinación de sus propiedades^{350,351}, entre las que destacan su baja toxicidad e inmunogenicidad, así como su alta biocompatibilidad, mucoadhesividad y afinidad para asociar diversidad de macromoléculas terapéuticas, como ADN y siARN (del inglés, “small interfering”), y antigénicas, protegiéndolas de la posible degradación enzimática e hidrolítica^{349,352,353}.

2.2.4.2. Síntesis de las nanocápsulas poliméricas

Las NCs poliméricas son sistemas vesiculares compuestos por un núcleo interno acuoso u oleoso hidrofóbico, considerado como un “depósito” capaz de encapsular fármacos poco solubles en agua, rodeado por una cubierta polimérica. El núcleo tiene la función de favorecer la encapsulación del fármaco y protegerlo del entorno fisiológico, mientras, la cubierta polimérica además de aportar estabilidad al sistema dentro y fuera del organismo, favorece el transporte del fármaco y/o controla su liberación^{354,355}. En la actualidad, debido al auge de estos nanomateriales, se han desarrollado numerosos métodos de síntesis entre los que encontramos: métodos basados en polimerización interfacial³⁵⁶, desplazamiento del solvente³⁵⁷ o adsorción de un polímero en una nanoemulsión (Figura 2.8.) preformada^{358,359}, entre otros.

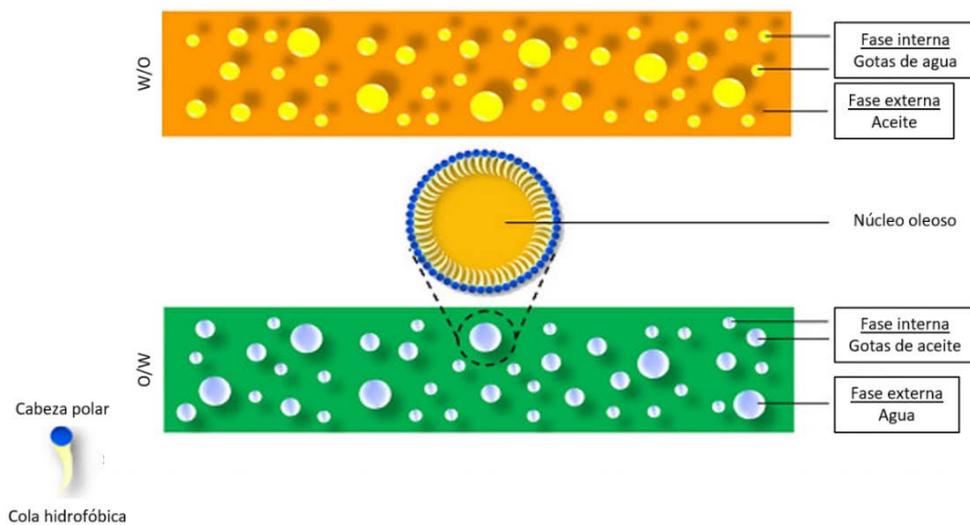


Figura 2.8.- Estructura de una nanoemulsión *oil-in-water*(O/W) o *water-in-oil*(W/O). Se trata de un sistema bifásico en el que una fase orgánica oleosa que contiene un compuesto surfactante hidrófilo se mezcla con una fase acuosa o viceversa, dando como resultado partículas que varían entre los 20 y 600 nm. Adaptación de ³⁶⁰.

Con el fin de mejorar la estabilidad de sus propiedades fisicoquímicas y de almacenamiento, así como para modificar su superficie dependiendo de su aplicación posterior, las NCs se recubren, durante o tras su síntesis, utilizando polímeros de distinta naturaleza ^{359,361,362}.

2.2.4.3. Aplicaciones de las NCs de quitosano en biomedicina

Cómo ya se ha descrito anteriormente, la administración convencional de fármacos suele presentar un gran número de limitaciones relacionadas con la necesidad de traspasar múltiples barreras fisiológicas, o la posible exposición al fármaco de los tejidos no afectados, lo que se traduce en una menor efectividad y un aumento de la toxicidad. El uso de nanotransportadores o *nanocarriers* (Figura 2.9.), permite solventar en gran medida estos problemas mejorando la especificidad, seguridad y eficiencia de los tratamientos ³⁶³.

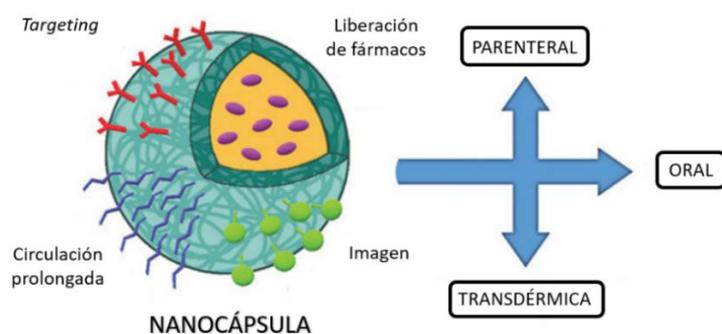


Figura 2.9.- Aplicaciones de las NCs y posibles vías de administración. Adaptación de ³⁶⁴.

Durante los últimos años, diversos estudios han demostrado la alta efectividad de las NCs de quitosano como nanotransportadores de diferentes moléculas en el campo de la biomedicina ^{365–367}, destacando por su uso en terapia génica ^{368–370}. Algunos ejemplos de ello son la descripción del silenciamiento *in vitro* de la proteína que codifica para el receptor SR-B1 (del inglés, “Scavenger Receptor- class B type 1”), evitando así la internalización del virus de la Hepatitis C en células HepG2 ³⁷¹; o la utilización de estos nanotransportadores *in vitro* para inhibir el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF; del inglés, “Vascular Endothelial Growth Factor”) en un modelo de melanoma de ratón, evitando la angiogénesis tumoral ³⁷².

2.2.5. Nanopartículas aprobadas actualmente para su uso en clínica

La *Food and Drug Administration* (FDA) en EE. UU. y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en Europa, son las entidades encargadas de regular y legislar las fases de investigación, desarrollo y aplicación de los nuevos nanofármacos en humanos y otras especies (Figura 2.10.).

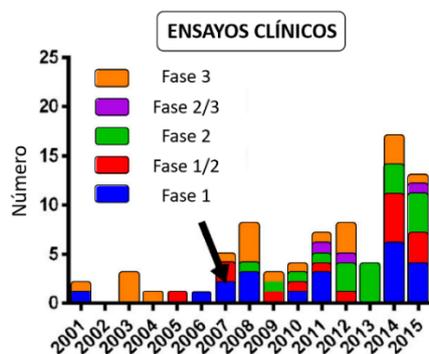


Figura 2.10.- Gráfico representativo de los diversos ensayos clínicos en sus diferentes fases de aprobación por la FDA desde el año 2001 hasta 2015. La flecha hace referencia al inicio de la legislación en EE. UU. (FDAAA801) por la cual, es de obligatorio cumplimiento la elaboración y presentación de informes respectivos a nuevos nanomateriales. Adaptación de clinicaltrials.gov.

La primera terapia basada en NPs consistió en una formulación de doxorubicina liposomal PEGilada denominada Doxil® en EE. UU. o Caelyx® en Europa, aprobada en 1995 para el tratamiento del sarcoma de Kaposi^{373,374}. Desde entonces, una gran variedad de NPs han sido aprobadas³⁷⁵ (Tabla 2.1.), siendo Onivyde® el fármaco liposomal más reciente, inhibidor de la topoisomerasa I, como tratamiento de segunda línea contra el cáncer de páncreas metastásico³⁷⁶.

LIPOSOMAS		
Marqibo® (Onco TCS)	Leucemia linfoblástica aguda	2012
Onivyde® (Merrimack)	Cáncer pancreático	2015
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS		
Krystexxa®/pegloticase (Horizon)	Gota tofácea crónica	2010
Cimzia®/certolizumab pegol (UCB)	Enfermedad de Crohn	2008
	Artritis reumatoide	2009
	Artritis psoriásica	2013
	Espondilitis anquilosante	
Plegridy® (Biogen)	Esclerosis múltiple	2014
ADYNOVATE (Baxalta)	Hemofilia	2015
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS		
Feraheme™/ferumoxytol (AMAG pharmaceuticals)	Anemia derivada de la enfermedad renal crónica	2009
Nanotherm® (MagForce)	Glioblastoma	2010

Tabla 2.1.- Fármacos basados en nanotecnología y aprobados por la FDA durante los últimos años para su uso en biomedicina. Adaptación de³⁷⁷.

2.3. Nanotoxicidad

La nanotecnología presenta un gran potencial, y una definición unívoca del término “nanomaterial” resulta esencial, especialmente en lo que se refiere a la gestión de los potenciales riesgos que estos puedan suponer para los seres humanos y el medio ambiente, ya que en la actualidad, cada vez son más los productos que contienen nanomateriales y, por lo tanto, la exposición a ellos se ha visto incrementada de forma exponencial. Es por ello por lo que surge la nanotoxicología, un área de estudio emergente que analiza los posibles efectos que provocan las NPs cuando estas entran en contacto con los sistemas biológicos ³⁷⁸.

Es importante destacar que, al tratarse de una ciencia relativamente joven, en la actualidad todavía no se han establecido directrices o estándares para evaluar la seguridad de las NPs, siendo las estrategias adoptadas para los estudios preclínicos, aquellas que se utilizan para el resto de los productos farmacéuticos ^{379,380}. Por consiguiente, resulta fundamental el desarrollo de nuevas formas de evaluación de riesgos para los diferentes tipos de NPs ^{381,382}, teniendo en cuenta que los posibles efectos toxicológicos dependen principalmente de los siguientes factores (Figura 2.11.): la vía de exposición (ingestión, inhalación, inyección o absorción dérmica), la dosis, la respuesta del organismo, la susceptibilidad o las propiedades fisicoquímicas específicas de cada partícula ³⁸³.

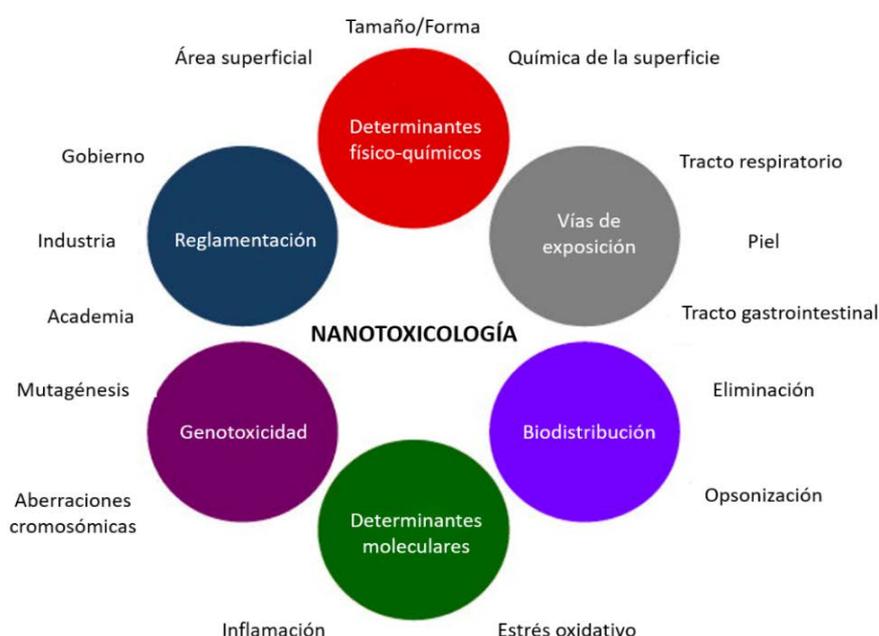


Figura 2.11.- Factores determinantes de la toxicidad de las NPs. Adaptación de ³⁸⁴.

2.3.1. Toxicidad de los nanomateriales

Las primeras observaciones sobre la toxicidad de las NPs de diferente naturaleza tras la exposición a las mismas, fueron puestas de manifiesto a nivel pulmonar, y por consiguiente, al ser transferidas al torrente circulatorio, se observaron daños cardiovasculares, hepáticos o del sistema nervioso central ³⁸⁵⁻³⁸⁸, e incluso se demostró que podían afectar al desarrollo embrionario ^{389,390}. Esto es debido a que las NPs son capaces de traspasar las múltiples barreras fisiológicas e interactuar con las proteínas del organismo provocando la inducción de ROS (Figura 2.12) ³⁹¹⁻³⁹³. En la actualidad, uno de los mecanismos de nanotoxicidad *in vitro* más estudiado, es el provocado por la inducción de estrés oxidativo en el interior de las células, debido a que la generación de ROS puede provocar alteraciones en el funcionamiento de órganos y/o tejidos, toxicidad metabólica y hematológica, genotoxicidad o inmunotoxicidad ³⁹⁴⁻³⁹⁶.

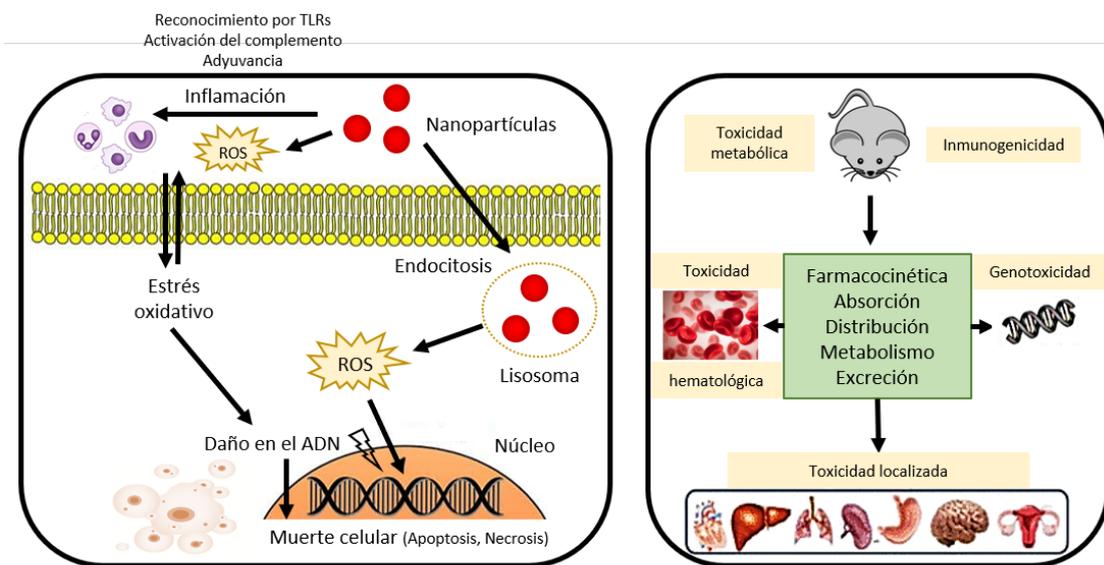


Figura 2.12.- Toxicidad de las NPs *in vitro* e *in vivo*. Las NPs son capaces de generar ROS tanto en el entorno como en el interior celular induciendo citotoxicidad relacionada con el estrés oxidativo - daño del ADN, muerte celular o apoptosis y detención del ciclo celular. *In vivo*, la farmacocinética de las NPs influye sobre la nanotoxicidad de las mismas, es decir, sobre la toxicidad en órganos, hematológica, genotoxicidad, metabólica y del sistema inmunológico. Adaptación de ³⁹⁷.

2.3.2. Inmunogenicidad de las nanopartículas

Una vez en el interior del organismo, las células del sistema inmune son capaces de reconocer a las NPs como elementos extraños, de forma semejante a como lo hacen con los patógenos y sus derivados. De esta forma, las NPs son capaces de promover respuestas de

INTRODUCCIÓN

inmunoestimulación o inmunosupresión, dando lugar a trastornos inflamatorios o autoinmunes, o a un aumento de la susceptibilidad del huésped frente a infecciones y cáncer ^{382,398}. Por ello, comprender los mecanismos de interacción de los nanomateriales con el sistema inmunológico es tan importante como analizar sus posibles efectos tóxicos ³⁹⁹.

Algunos estudios han demostrado los efectos de las NPs sobre la inmunidad innata vía TLR, a pesar de que los mecanismos de interacción entre ambos todavía se desconocen ^{400,401}; o mediante la activación del inflamasoma NLRP3 ⁴⁰²⁻⁴⁰⁴, revelando que las partículas catiónicas (cargadas positivamente) son más propensas a inducir reacciones inflamatorias que las especies aniónicas (cargadas negativamente) y neutras. Un ejemplo de ello son las AuNPs, las cuales han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* ser capaces de inducir la expresión de citocinas proinflamatorias en función de su tamaño y la dosis administrada ⁴⁰⁵⁻⁴⁰⁷, así como presentar efectos inhibitorios sobre la maduración y la función antitumoral de las DCs ⁴⁰⁸. Sin embargo, en contraposición, encontramos otra serie de estudios que describen como las AuNPs poseen propiedades antiinflamatorias ⁴⁰⁹⁻⁴¹¹, lo que nos lleva a pensar que todavía se debe de continuar investigando sobre la influencia de los distintos nanomateriales sobre el sistema inmunológico en función de sus propiedades fisicoquímicas.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Capítulo 3.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La inflamación es un mecanismo clave en la regulación del sistema inmune, que permite la destrucción de agentes patógenos o la eliminación de células tumorales en condiciones fisiológicas. Sin embargo, cuando la respuesta inflamatoria no se regula de forma adecuada es la principal causa de enfermedades tipo inflamatorio y/o autoinmune de difícil tratamiento ⁴¹². Algunos miembros de la familia de las proteasas de serina *gzms*, como la *gzmA* o la *gzmK*, que ejercen funciones proinflamatorias regulando la producción de citocinas como IL-1 β , IL-6 o TNF- α ^{34,413,414}, modulan el balance entre inmunidad protectora o patológica ^{33,415}. Recientemente en nuestro grupo de investigación se caracterizó que la *gzmA* juega un papel fundamental *in vivo* en algunos procesos inflamatorios como la sepsis bacteriana ²²², la AR ²¹⁷ o el CCR ⁴¹⁶. Conjuntamente, se han detectado niveles elevados de la *gzmA*, *gzmB* y/o *gzmK* solubles en fluidos de pacientes con diversas patologías inflamatorias/autoinmunes ^{221,232}. Sin embargo, se desconoce la relevancia fisiopatológica de estas *gzms* extracelulares y, aún más importante, si son funcionalmente activas en dichos fluidos y por lo tanto capaces de contribuir a la progresión de la enfermedad, pudiendo tratarse así tanto de posibles biomarcadores de pronóstico como de dianas terapéuticas.

Durante los últimos años, la nanotecnología se ha convertido en una de las principales promesas en el campo del desarrollo de nuevos fármacos más selectivos y con menos efectos secundarios, ya que multitud de nanomateriales han mostrado ser soportes óptimos para la conjugación o vehiculización de moléculas a utilizar en aplicaciones biomédicas. En particular, las AuNPs presentan ventajas adicionales con respecto a otros tipos de nanomateriales, exhibiendo excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico ⁴¹⁷, además de ser fácilmente sintetizadas y funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos. Sin embargo, y aunque el oro se define como un metal seguro y estable ⁴¹⁸, se ha demostrado que las propiedades fisicoquímicas de las AuNPs influyen directamente sobre su toxicidad ⁴¹⁹. Por ello, la nanotoxicología, un área multidisciplinar recientemente emergida, plantea la realización, junto con los estudios más convencionales de citotoxicidad, como la generación de ROS ⁴²⁰, de un análisis más amplio y detallado de cada uno de los diferentes tipos de NPs, entre los que se incluyen los estudios de inmunogenicidad, ya que se ha demostrado que las NPs son capaces de interactuar con los sistemas biológicos pudiendo llegar a causar multitud de efectos adversos

⁴²¹.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Considerando todos los antecedentes expuestos con anterioridad, los cuales sugieren, por un lado, la participación de la gzmA extracelular en determinadas patologías de carácter inflamatorio, y por otro, la ventaja del uso de nanomateriales para el diagnóstico y la terapia de las mismas, nos planteamos en el presente trabajo la siguiente **hipótesis**: la detección de la gzmA extracelular podría utilizarse como marcador de diagnóstico en sepsis, mientras que su inhibición selectiva haciendo uso de nanomateriales podría servir como posible diana terapéutica para reducir la inflamación evitando posibles reacciones adversas. Asimismo, el estudio más exhaustivo de la influencia de estos nanomateriales sobre la respuesta inmune podría ser clave para confirmar su seguridad e impulsar su uso responsable y sostenible.

Para ello, este proyecto de tesis se dividió en tres grandes bloques, ambos encaminados al estudio y la modulación de la respuesta inflamatoria. Cada uno de ellos con un **objetivo principal** y con una serie de **objetivos intermedios**.

1. Detección de la actividad enzimática de la gzmA mediante el uso de un biosensor basado en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET; del inglés, “Fluorescence Resonance Energy Transfer”):

- Diseñar el biosensor, seleccionar los péptidos y los fluoróforos, y determinar su eficiencia de FRET previa funcionalización a la secuencia peptídica.
- Estudiar la sensibilidad y la especificidad del biosensor mediante el uso de la gzmA recombinante de origen murino y humano, y otras proteasas análogas con diferente o similar especificidad de corte.
- Validar el biosensor de la gzmA utilizando lisados de tejidos y fluidos biológicos procedentes de ratones wild-type (WT), ratones gzmA^{-/-} y ratones gzmK^{-/-}.
- Validar el biosensor de la gzmA utilizando muestras de suero correspondientes a varias tomas realizadas a lo largo de la hospitalización de diferentes pacientes con sepsis.
- Establecer si existe correlación entre la actividad enzimática de la gzmA extracelular de los pacientes con sepsis determinada mediante el uso del biosensor, con su concentración y con el pronóstico de la enfermedad.

2. Bloqueo específico de la expresión génica de la mGzmA:

- Generar una línea celular estable que exprese la proteína mGzmA unida a GFP (del inglés, “Green Fluorescent Protein”), partiendo de la línea celular humana de cáncer de cérvix uterino, HeLa.
- Estudiar el silenciamiento génico *in vitro* de la mGzmA mediante lipofección con Lipofectamina o mediante el uso de NCs de quitosano como sistemas de vehiculización selectiva.
- Estudiar el grado de internalización *in vitro* de las NCs de quitosano en células que expresen gzmA de modo nativo de origen murino y humano.
- Estudiar la biodistribución *in vivo* de las NCs y MCs de quitosano funcionalizadas con sondas fluorescentes para su visualización en el tracto gastrointestinal de ratones WT.

3. Análisis del efecto de las nanopartículas de oro sobre el sistema inmune:

- Estudiar el efecto *in vitro* de varias AuNPs con diferencias en su superficie sobre la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α en M \emptyset derivados de médula ósea de ratón.
- Estudiar el efecto *in vitro* de las AuNPs preseleccionadas sobre la maduración de DCs derivadas de médula ósea de ratón.
- Estudiar el efecto *in vivo* de las AuNPs preseleccionadas en el modelo de melanoma murino B16: crecimiento tumoral, expresión de mediadores pro- y antiinflamatorios, y análisis de las diferentes poblaciones inmunológicas que conforman el TME.
- Estudiar el efecto *in vivo* de la combinación de las AuNPs con el tratamiento inmunoterapéutico anti-PD-1 en el modelo de melanoma murino B16.

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo 4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Técnicas de biología molecular

4.1.1. Preparación de células competentes de *E. coli*

El método utilizado para la preparación de células competentes se basa en la apertura de poros en la membrana con CaCl_2 a baja temperatura. Previamente a la realización de cualquiera de los pasos a seguir en este protocolo, todos los medios y materiales utilizados fueron esterilizados. Se preparó un precultivo mediante la inoculación de 10 μl de bacterias *Escherichia coli* en 10 ml de LB (del inglés, "Lysogeny Broth") (Anexo I) y se mantuvo a 37°C durante 16-24 horas a 200-250 rpm. A este precultivo se le añadieron 100 ml de LB fresco y se incubó de nuevo a 37°C, en este caso durante 2 horas, con el objetivo de alcanzar una densidad óptica adecuada de $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,4$. Una vez alcanzada dicha absorbancia, el cultivo se transfirió a 2 tubos de fondo cónico estériles de 50 ml, se mantuvo durante 30 minutos en hielo para detener su crecimiento y finalmente, se centrifugó durante 5 minutos a 1500 xg a 4°C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron con cuidado en 1 ml de tampón de trituración frío (Anexo I) hasta su homogeneización. Se adicionaron 30 ml del mismo tampón y se mezclaron de nuevo con cuidado. Se centrifugaron durante 15 minutos a 3000 xg a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 4 ml de tampón de conservación frío (Anexo I) y se prepararon alícuotas de unos 400 μl en tubos de Eppendorf, listos para su transformación o congelación a -80 °C.

4.1.2. Transformación de células competentes de *E. coli*

Durante este trabajo, los constructos de ADN empleados fueron transformados en cepas de *E. coli* BL21-CodonPlus o DH5 α , dado que el objetivo de la transformación era la obtención de ADN plasmídico en cantidad suficiente. Para la transformación de las bacterias competentes se empleó el método de choque térmico.

Partiendo de ADN reconstituido con H_2O MilliQ a una concentración de 200 ng/ μl , se adicionaron 100 ng sobre una alícuota de células competentes (Apartado 4.1.1.). Se incubaron en hielo durante 20-30 minutos, se realizó un choque térmico a 42°C durante 60 segundos, y a continuación, se dejaron en reposo durante 2 minutos en hielo para que las membranas celulares

MATERIALES Y MÉTODOS

volvieron a sellarse y el ADN quedase confinado en su interior. Se adicionó 1 ml de SOC (del inglés, "Super Optimal Broth") frío (Anexo I), y se recuperaron las células durante un periodo de 1-3 horas a 37°C a 200-250 rpm. Finalmente, se procedió a la selección de aquellas bacterias que habían incorporado el plásmido. Para ello, se centrifugaron a 1300 xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante dejando un volumen mínimo y se sembraron unos 150 µl en placas de LB agar o LB-LS (del inglés, "Lysogeny Broth-Low Salt") agar (Anexo I), dependiendo de si trabajamos con BL21-CodonPlus o DH5α respectivamente, que contenían el correspondiente antibiótico de selección (100 µg/ml de ampicilina - Roche o 25 µg/ml de zeocina - InvivoGen), y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Durante este procedimiento, se sembró también un control negativo con células competentes sometidas a todos los pasos descritos anteriormente en ausencia de plásmido, es decir, bacterias no transformadas. Transcurrido este tiempo, se seleccionaron varias colonias de la placa, transfiriendo cada una a un tubo de fondo cónico estéril con 10 ml de LB o LB-LS suplementado con el antibiótico de selección. La suspensión bacteriana se incubó a 37°C con agitación durante toda la noche.

4.1.3. Extracción del ADN plasmídico

Para obtener pequeñas cantidades de ADN plasmídico se utilizó GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen de cultivo de partida fue 1,5-3 ml y la elución final se realizó con 50 µl de H₂O milliQ estéril. Para obtener cantidades mayores de plásmido, se necesitaron cultivos de 50-100 ml, utilizando Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit (BioRad) para extraer el ADN. En este caso, las eluciones se realizaron en 500 µl de H₂O milliQ estéril. Las concentraciones de los plásmidos se midieron en alícuotas de 2 µl con el espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (ThermoFisher).

4.1.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para evaluar el ADN plasmídico, se realizó una electroforesis en gel de agarosa en la que la movilidad de los fragmentos es inversamente proporcional a su tamaño, por lo que, a menor tamaño, mayor será el desplazamiento.

Se realizó el gel a una concentración del 1% de agarosa en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE; Invitrogen) 1X para los geles de análisis o tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE; Invitrogen) 1X para los geles destinados a purificación, con SYBR Safe (1:10000, Invitrogen) para la visualización posterior

de las muestras bajo luz UV. Previamente a su adición a los pocillos, el ADN se combinó con el tampón de carga 10X (Takara) para conocer en todo momento la posición del frente en el gel. Los marcadores de pesos moleculares empleados fueron 1kb y 100bp DNA Ladder (Invitrogen) para la estimación del peso de los fragmentos de ADN mediante comparativa. La electroforesis se realizó mediante una diferencia de potencial de 90V y 400mA durante 30-40 minutos y su visualización se realizó en un transiluminador Gel Doc 2000 (BioRad).

4.1.5. Purificación de fragmentos de ADN en gel de agarosa

La purificación de los fragmentos de ADN de interés, bien tras una PCR (del inglés, "Polymerase Chain Reaction") o tras la digestión con enzimas de restricción, se llevó a cabo a partir de un gel de agarosa al 1% en TAE con Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. En los dos casos, se separaron los fragmentos de ADN mediante electroforesis y se procedió al corte de la banda de peso molecular deseado empleando un bisturí estéril. Para evitar exponer la banda de interés a la luz UV del GelDoc, se usó como señal una pequeña cantidad del ADN en otro pocillo de modo que se podía comprobar la amplificación o digestión, y así aislar la banda. La concentración del ADN se midió en alícuotas de 2 µl con el espectrofotómetro Nanodrop™ 2000.

4.1.6. Secuenciación del ADN

Una vez purificado el fragmento de ADN, se mandó a secuenciar en el Servicio de secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid).

4.1.7. Digestión del ADN

Una vez obtenido el cADN de las proteínas para su clonaje en el vector retroviral pBABE, se procedió a su digestión con las correspondientes enzimas de restricción según las indicaciones del fabricante. Para ello, se añadió 1 µl de cada una de las enzimas de restricción (Takara) necesarias con el tampón de reacción correspondiente (10X), 50 ng inserto/100 ng plásmido, y se completó con H₂O milliQ estéril y libre de ARNasas hasta 10 µl. La mezcla se incubó en baño seco a 37°C durante 3 horas.

4.1.8. Ligación del ADN

El último paso para la obtención del vector con su correspondiente inserto es la ligación del plásmido linearizado con los fragmentos previamente digeridos. La proporción vector/inserto dependió de las concentraciones de partida de ambos, pero como mínimo el inserto estuvo al doble de concentración molar del vector. La mezcla de ligación también contenía 1 µl de T4 DNA ligasa (ThermoFisher) con el tampón de la enzima (10X) y H₂O milliQ estéril y libre de ARNasas hasta completar los 10 µl. Las muestras se dejaron durante 2 horas a temperatura ambiente (RT; del inglés, “Room Temperature”) y transcurrido este tiempo, se procedió a la transformación de las bacterias competentes (Apartado 4.1.2.).

4.1.9. Diseño de oligonucleótidos y amplificación de secuencias

El diseño de los oligonucleótidos y la determinación de las condiciones óptimas para la amplificación de las diferentes secuencias a clonar se llevaron a cabo con la ayuda del programa OLIGO Primer Analysis Software Version 7 (Molecular Biology Insights). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Invitrogen y fueron diseñados para la incorporación de los sitios de restricción EcoRI en el extremo 5' terminal y Sall en el extremo 3' terminal para la posterior ligación en el vector entre estos dos sitios de corte.

Directo → 5'- GACTCGGAATTCATGAAAATTATTGGGGGGGATACCGTC - 3'

Reverso → 5'- GACTCGGTCGACTCATTTATACAGCTCGTCCATCCCG - 3'

El vector empleado en este trabajo fue pBABE-puro (Figura 4.1.), cedido por el Dr. Reinhard Wallich de la Universidad de Heidelberg en Alemania.

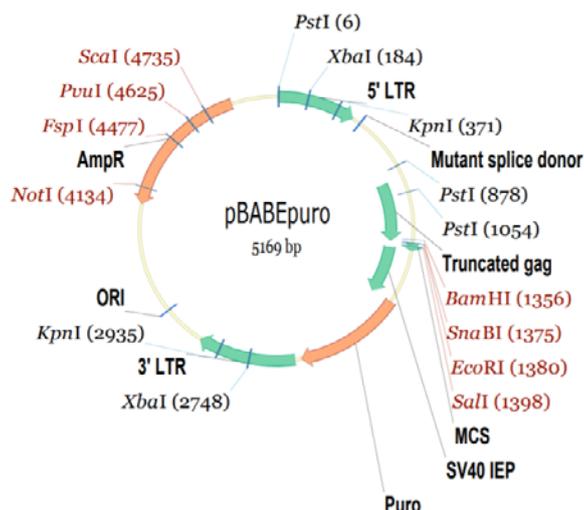


Figura 4.1.- Vector pBABE-puro.

La amplificación a partir del cADN molde se realizó empleando la polimerasa de alta fidelidad AccuPrime™ Pfx SuperMix (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción contenía:

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (μL)
ADN	10 pg-200 ng	-
Oligonucleótido Directo	10 μM	1
Oligonucleótido Reverso	10 μM	1
AccuPrime™ Pfx SuperMix.	1X	22,5
H ₂ O MilliQ	-	Hasta V _F =25 μl

Tabla 4.1.- Componentes de la mezcla de reacción.

Las reacciones de amplificación del ADN se llevaron a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones:

- Un ciclo inicial de 5 minutos a 95°C.
- 35 ciclos de 15 segundos a 95°C para provocar la desnaturalización de las hebras, 30 segundos a 57°C para permitir la hibridación de los oligonucleótidos y 1 minutos y 45 segundos a 68°C para la extensión de la cadena.
- Un ciclo final de 5 minutos a 68°C.

4.1.10. Extracción de ARN y determinación de la expresión génica mediante

RT-qPCR

La extracción de ARN total se llevó a cabo mediante el RNeasy Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de ARN se midieron en alícuotas de 2 μ l con el espectrofotómetro Nanodrop™ 2000. Posteriormente, a partir del ARN total (100-500 ng), se generó cADN con la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen Life Technologies). Finalmente, se realizó la PCR semicuantitativa en tiempo real usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en el equipo de PCR a Tiempo Real ViiA7 (Applied Biosystems). Se utilizaron tanto los cebadores como las condiciones descritas en el Apartado 4.1.9. Para la normalización de los niveles relativos de expresión del mRNA de la *gzmA*, se testaron los cebadores específicos de HPRT (del inglés, “Hypoxanthineguanine Phosphoribosyltransferase”) y GAPDH (del inglés, “Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase”) y se utilizó el método comparativo ($2^{-\Delta\text{ct}}$).

HPRT-Directo \rightarrow 5'- CTGACCTGCTGGATTACA - 3'

HPRT-Reverso \rightarrow 5'- GCGACCTTGACCATCTTT - 3'

GAPDH-Directo \rightarrow 5'- ATCAGCAATGCCTCCTGCAC - 3'

GAPDH-Reverso \rightarrow 5'- TGGCATGGACTGTGGTCATG - 3'

4.2. Expresión y purificación de la granzima A

Todos los protocolos descritos en este apartado se realizaron en colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Dr. Ramón Hurtado Guerrero del Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI).

Durante este trabajo se utilizaron las proteínas recombinantes *gzmA* de ratón (mGzmA) y *gzmA* humana (hGzmA), ambas diseñadas y producidas en nuestro grupo de investigación. Mientras que para la mGzmA se siguió todo el procedimiento que se describe a continuación, para la hGzmA se inició directamente su producción y purificación, puesto que previamente en el grupo se habían realizado y seleccionado los transfectantes de *Pichia pastoris* X33 y se habían realizado sus correspondientes pruebas de expresión.

4.2.1. Plásmido codificante para la gzmA

La secuencia de ADN codificante para los residuos de aminoácidos de la proteasa mGzmA, fue optimizada y sintetizada por la empresa GenScript para la expresión en *P. pastoris* en el vector de expresión pPICZ α A (Figura 4.2.). Mientras, la secuencia de la hGzmA fue sintetizada en el vector pUC57 (GenScript), siendo posteriormente subclonada en pPICZ α A para su expresión en *P. pastoris* tras el corte con las enzimas de restricción XhoI-extremo 5' terminal y -SacII extremo 3' terminal. Ambas secuencias de ADN contenían una secuencia de dos residuos en el extremo 5' terminal que codifica la expresión del zimógeno de la gzmA.

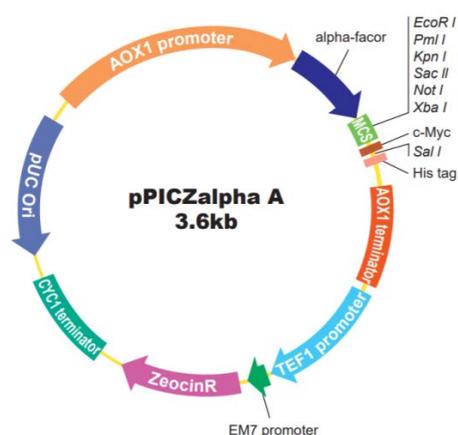


Figura 4.2.- Vector pPICZ α A. Fuente: <https://www.genscript.com/gsfiles/vectormap/yeast/pPICZalpha-A.pdf>

4.2.2. Digestión/linearización y purificación del ADN plasmídico

Una vez comprobada la extracción del ADN plasmídico según el protocolo descrito en el Apartado 4.1.3., se realizó la digestión del plásmido con la enzima de restricción SacI-HF (New England Biolab) a 37°C durante toda la noche. A continuación, mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Apartado 4.1.4.), se comprobó la correcta linearización del plásmido y se purificó haciendo uso del kit comercial Accuprep Gel Purification (Bionner), obteniendo finalmente 26 μ l/muestra purificada eluida con H₂O MilliQ a 65°C, lo cual se ha comprobado que aumenta el rendimiento de recuperación del ADN. Una vez realizada la extracción, la muestra se almacenó a -20°C hasta su posterior incorporación en *Pichia* mediante electroporación.

MATERIALES Y MÉTODOS

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (μ L)
ADN	140 μ g/ml	0,1 μ g/ml	180
Sacl-HF	20000 U/ml	560 U/ml	7
Tampón de Sacl-HF	10X	1X	25
H ₂ O MilliQ	-	-	38

Tabla 4.2.- Componentes de la linearización del ADN plasmídico.

4.2.3. Preparación de células electrocompetentes de la cepa de *P. pastoris*

X33

Se seleccionó la cepa silvestre X33 de la levadura *P. pastoris*, una cepa con fenotipo mut⁺ ampliamente utilizada para la expresión de proteínas y muy útil para la selección de clones recombinantes resistentes a zeocina, así como para crecimiento a gran escala. Para la preparación de células electrocompetentes se siguió la metodología descrita en el manual EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen).

Se sembraron 60 μ l de células X33 en una placa de YPDS (del inglés, “Yeast extract-Peptone-Dextrose-Sorbitol medium”) (Anexo I) y se dejaron crecer a 30°C durante aproximadamente 72 horas. Una vez crecida la placa, se seleccionaron varias colonias de manera independiente para iniciar un precultivo de cada una de ellas en 5 ml de YPD (del inglés, “Yeast extract-Peptone-Dextrose medium”) (Anexo I), permaneciendo a 30°C durante aproximadamente 8 horas a 200-250 rpm. Transcurrido este tiempo, 500 μ l de cada precultivo fueron añadidos sobre 100 ml de YPD fresco en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml para su incubación a 30°C en agitación 200-250 rpm durante toda la noche, con el objetivo de alcanzar una $OD_{600nm}=1,5$, momento en el que las células se encuentran en su fase exponencial de crecimiento. A continuación, las células obtenidas se centrifugaron durante 5 minutos a 1500-2000 xg a 4°C y se utilizó la relación descrita según ⁴²², es decir, 10^8 células se resuspendieron en 1 ml de una disolución compuesta por 10mM de acetato de litio, 0,6 M de sorbitol, 10mM de TRIS-HCl y 10mM de DTT (del inglés, “Dithiothreitol”) pH1.5, considerando que una $OD_{600} = 1$ corresponde a 3×10^7 células. Una vez resuspendidas y transcurridos 30 minutos a RT, se centrifugaron de nuevo durante 5 minutos a 2000 xg y 4°C para ser lavadas mediante la adición de 1,5 ml de una solución estéril y fría de 1 M

sorbitol, durante 3 veces consecutivas. Finalmente, añadiendo 1 ml de 1 M sorbitol por cada 10^{10} células, se conservaron en hielo hasta su posterior uso. Es importante tener en cuenta la pérdida de competencia de *Pichia*, en el caso de no realizar este procedimiento seguido de su transformación.

4.2.4. Transformación de la cepa de *P. pastoris* X33

Para llevar a cabo la transfección por electroporación, se mezclaron 80 μ l de células electrocompetentes de *P. pastoris* con 5-10 μ g del vector pPICZ α linearizado y purificado (Apartado 4.2.2.) y se transfirieron a una cubeta de electroporación (Gene Pulser/Micropulser Electroporation Cuvettes, Bio-Rad) de 0,2 cm de grosor previamente enfriada. Una vez transferidas las células y el vector a la celda, esta se incubó en hielo durante 5 minutos y se llevó a cabo la electroporación por medio de un electroporador Micropulser (BioRad) con el parámetro preestablecido para *Pichia* de V=2,0 kV. Mediante la aplicación del pulso eléctrico, se abren los poros en la célula a través de los que entra el ADN cargado negativamente. Después del pulso, las células fueron rápidamente recuperadas de la celda mediante la adición de 1 ml de 1 M sorbitol estéril frío y transferidas a un tubo de fondo cónico de 15 ml en el que se dejaron incubando a 30°C sin agitación durante 1-3 horas.

A continuación, se plaquearon 100 μ l de la mezcla sobre una placa de YPDS suplementada con zeocina (200 μ g/ml) para la selección de los transfectantes, y se mantuvo en incubación durante 72-96 horas a 30°C hasta la aparición de colonias. Como control negativo, se sembraron células sometidas al mismo procedimiento de electroporación en ausencia de ADN. Siete de las colonias crecidas fueron resembradas sobre una nueva placa de YPD con zeocina (200 μ g/ml) para comprobar la presencia del inserto mediante la realización de pruebas de expresión.

4.2.5. Conservación en glicerol de las colonias de *P. pastoris* X33

Previo a la selección de la colonia que mejor expresa el constructo deseado, cada una de las siete colonias crecidas, se sembró de forma individual sobre una placa de YPD con 200 μ g/ml de zeocina y se dejó crecer durante 48 horas a 30°C. Una vez crecidas y siempre en esterilidad, se recogieron $\frac{3}{4}$ partes de las células y se resuspendieron en un tubo cónico de 15 ml con 3 ml de una solución compuesta por un 70% de YPD y un 30% de glicerol. A continuación, se realizaron alícuotas de las mismas para su congelación a -80°C hasta su posterior selección en función de

MATERIALES Y MÉTODOS

los resultados obtenidos a través de las pruebas de expresión, momento en el que se desecharon todas aquellas colonias no seleccionadas.

4.2.6. Expresión de la *gzmA* en *P. pastoris* X33

Antes de comenzar con la expresión a gran escala, debemos de comprobar que las levaduras realmente sobreexpresan la proteína mediante la realización de pruebas de expresión siguiendo el protocolo recomendado por ⁴²³. Para ello, se inició el crecimiento de aquellas colonias que fueron seleccionadas tras su electroporación con el plásmido de interés, utilizando tubos de fondo cónico de 50 ml que contenían 1 ml de BMGY (del inglés, “Buffered Glycerol-complex Medium”) (Anexo I). Tras su incubación a 30°C y 200-250 rpm durante 24 horas, se centrifugaron las células 10 minutos a 3800 xg y 4°C y se resuspendió el pellet así obtenido en 1 ml de BMMY (del inglés, “Buffered Methanol-complex Medium”) (Anexo I), para su incubación a 18°C y 200-250 rpm durante 72 horas. Durante la inducción de la expresión, se fue añadiendo un 1% de metanol puro cada 24 horas sobre cada uno de los tubos de fondo cónico de 50 ml, obteniendo así una mayor expresión de la proteína deseada. Transcurrido este periodo, se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C y 3800 xg para recuperar los sobrenadantes, ya que la expresión de la *gzmA* es extracelular, que posteriormente se analizaron por electroforesis desnaturizante en SDS-PAGE (del inglés, “Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”) (Apartado 4.3.2.2.).

Una vez seleccionada la colonia con mayor expresión, se llevó a cabo el mismo procedimiento anteriormente descrito pero esta vez a gran escala, es decir, variando los volúmenes hasta 1-2L para la producción final de la *gzmA* recombinante. Se sembraron 60 µl del glicerol en una placa de YPD con 200 µg/ml de zeocina y se dejó crecer durante 48 horas a 30°C. Se recogieron $\frac{3}{4}$ partes de las células y se resuspendieron en 250 ml de BMGY en un matraz de Erlenmeyer de 2L durante 16-20 horas a 30°C y 200-250 rpm. La relación entre el volumen del matraz y el volumen del cultivo es importante dado que, para un crecimiento adecuado de las levaduras, estas requieren de un máximo de aireación. A continuación, se centrifugaron a 6000 xg durante 10 minutos para descartar el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en otros 250 ml de BMMY durante 72-96 horas a 18°C y 200-250 rpm, añadiendo de nuevo metanol puro al 1% cada 24 horas. Transcurrido este tiempo, se recogió el sobrenadante de cada uno de los matraces por centrifugación a 6000 xg durante 20 minutos a 4°C y se purificó, tal y como se describe en el Apartado 4.2.8.

4.2.7. Concentración y diálisis de la gzmA

Con anterioridad a realizar la purificación de la gzmA, el sobrenadante obtenido debe de ser filtrado por 0,45 μm y 0,22 μm (Merck-Millipore) mediante un equipo de filtración a vacío, para eliminar los restos celulares que hayan podido quedar en suspensión. Una vez centrifugado y filtrado, el sobrenadante se concentró con la ayuda de un concentrador Pellicon XL Biomax 10 kDa (Merck-Millipore) acoplado a una bomba peristáltica MasterFlex (Cole-Parmer™) hasta obtener un volumen final de aproximadamente 40 ml. Finalmente, se realizaron 3 diálisis con 100 volúmenes del tampón 25mM MES pH6 a 4°C durante un mínimo de 2 horas cada una de ellas.

4.2.8. Purificación por cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se basa en la separación de las proteínas en función de su carga neta superficial, a través de interacciones electrostáticas con la fase estacionaria que conforma la columna, y se trata de una de las técnicas más comúnmente empleadas para la purificación de proteínas.

La purificación de la gzmA se realizó utilizando una columna Hi-Trap SP XL de 5ml (GE Healthcare) acoplada a un sistema de cromatografía ÄKTA start (GE Healthcare), previamente equilibrada con 5 volúmenes del tampón 25mM MES pH6. Una vez preparada la columna, el sobrenadante de *Pichia* concentrado, filtrado y dializado, fue cargado en la misma. A continuación, se lavó la columna con 5 volúmenes del tampón 25mM MES pH6, 150mM NaCl para eluir todas aquellas inespecificidades adheridas a la columna. Finalmente, mediante un gradiente de NaCl de hasta 1M, la gzmA fue eluida en alícuotas de 1-2 ml para ser analizada posteriormente mediante electroforesis desnaturalizante en SDS-PAGE (Apartado 4.3.2.2.) y Western-Blot (Apartado 4.3.2.4.).

Las fracciones con mayor concentración de proteína fueron unidas y dializadas con el tampón MT-PBS (del inglés, "Phosphate Buffered Saline") (Anexo I) pH5.5, 0,2 M acetato de sodio, utilizando columnas de desalinización desechables PD-10 (GE Healthcare). Se recogieron de nuevo alícuotas de 1-2ml, se midió su concentración con el espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 utilizando su coeficiente de extinción teórico y se mantuvieron a -80°C hasta su posterior uso. De esta forma, al conservar la gzmA en forma inactiva se evita que en el proceso de descongelación se produzca una pérdida de actividad.

4.2.9. Activación de la gzmA

Una vez purificada la forma inactiva de la gzmA, se procedió a su activación utilizando la enzima catepsina C (Sigma), capaz de escindir el dipéptido MK presente en el extremo N-terminal del constructo de la gzmA, responsable de su inactividad. Para ello, previamente se activó la catepsina C con 2mM de DTT a 37°C durante 30 minutos. Una vez activa, se eliminó el DTT mediante diálisis con el tampón MT-PBS pH5.5, 0,2 M acetato de sodio y se reservó una alícuota de la misma para llevar a cabo un ensayo de actividad (Apartado 4.2.10.) frente a un sustrato colorimétrico específico, H-Gly-Phe-pNA (Bachem). Una vez activada la catepsina C, se utilizó una relación de 5U por cada 10 mg de la pro-gzmA y se incubaron durante toda la noche a RT. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo una diálisis de la gzmA con 100 volúmenes de su tampón de actividad 100mM TRIS-HCl pH8.5, se realizaron alícuotas de aproximadamente 100 µl y se congelaron a -80°C para uso dentro de un periodo de tiempo relativamente corto.

Como control negativo, se usó catepsina C sin activar, tampón de actividad solo y el sustrato de la catepsina C disuelto en tampón de actividad. Se incubó a 37°C y se realizaron mediciones a 405/490 nm cada hora en un lector de placas Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek).

4.2.10. Determinación de la actividad enzimática de la gzmA mediante absorbancia

Se determinó la actividad enzimática de la gzmA mediante su sustrato específico colorimétrico, Bz-Pro-Phe-Arg-pNA-HCl (Bachem) para la mGzmA y Z-Gly-Pro-Arg-pNA acetate salt (Bachem) para la hGzmA, en su tampón de actividad 100mM TRIS-HCl pH8.5. Sobre una placa de 96 pocillos se añadieron 50 µl del sustrato a una concentración final de 150 µM y 50 µl de la proteasa activa a diferentes concentraciones. Las muestras se incubaron a 37°C durante distintos tiempos (0, 60, 120 y 240 minutos) y las medidas se llevaron a cabo por triplicado a 405/490 nm en un lector de placas. Como control positivo se utilizó la línea murina de CTLs 1.3E6SN⁴²⁴ y como control negativo la línea tumoral murina EL4.F15⁸¹.

4.2.11. Determinación de la actividad enzimática de la gzmA mediante fluorescencia

Para la determinación de la actividad enzimática de la gzmA se utilizó la espectroscopia de fluorescencia, también denominada fluorimetría, basada en la emisión de la energía absorbida en forma de luz a partir de un fluoróforo excitado. Cuando dos fluoróforos compatibles se encuentran a una determinada distancia, esta energía puede ser transferida de un fluoróforo donador a un fluoróforo aceptor. Como resultado de esta transferencia de energía, la fluorescencia del donador se apaga y se inicia la emisión de la fluorescencia del aceptor, proceso denominado como FRET ⁴²⁵. Sin embargo, no todas las combinaciones de fluoróforos emiten luz, sino que algunos fluoróforos aceptores, conocidos como quenchers, disipan esta energía absorbida en forma de calor a través de vibraciones moleculares ⁴²⁶.

Basándonos en este último concepto, la cuantificación de la actividad de la gzmA se llevó a cabo empleando dos sustratos específicos fluorescentes, VANRSAS y EDMAKSDKAR, en su tampón de actividad 100mM TRIS-HCl pH8.5. Sobre una placa de 96 pocillos se añadieron 50 μ l del sustrato a una concentración final de 1 μ M y 50 μ l de la proteasa activa a diferentes concentraciones. Las muestras se incubaron a 37°C durante distintos tiempos (1, 4 y 24 horas) y las mediciones se llevaron a cabo con una longitud de onda de excitación de 475 nm en un espectrofluorímetro FluoroMax-P de Yobin Ivon (Horiba) completamente controlado por el software para espectroscopía DataMax. En todas las medidas de espectroscopía se utilizaron cubetas de cuarzo limpias y completamente secas.

4.3. Análisis e identificación de proteínas

4.3.1. Cuantificación mediante el método de Bradford

Se cuantificó la concentración de proteínas recombinantes y de proteínas totales extraídas de lisados celulares o de tejidos, mediante el ensayo Bradford. Para ello se utilizó el kit Quick Start™ Bradford Protein Assay (BioRad). Brevemente, se preparó la curva patrón de albumina de suero bovino (BSA; del inglés, "Bovine Serum Albumin") como se indica en el manual de procedimiento del Kit. Se utilizó como diluyente el mismo tampón en el que se disolvieron las

MATERIALES Y MÉTODOS

muestras a analizar. Se cargaron 5 μ l de las diferentes concentraciones de la curva patrón y de las muestras, por triplicado, en una placa de 96 pocillos y, a continuación, se añadieron 245 μ l del reactivo. Se incubó a RT durante 5 minutos y finalmente, se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas. Se determinó la concentración mediante la interpolación de los resultados en la recta de calibrado.

4.3.2. Análisis de proteínas por Western-Blot

4.3.2.1. Extracción de proteínas totales a partir de lisados celulares

Para realizar los lisados celulares, en el caso de partir de un tejido, inicialmente fue necesario realizar el disgregado utilizando un émbolo de una jeringuilla estéril sobre una placa de Petri hasta obtener una suspensión celular, y seguidamente realizar un filtrado mediante un filtro de nylon de 70 μ m (Falcon). A continuación, se recogieron las células a analizar, se lavaron con PBS estéril y se resuspendieron con tampón de lisis RIPA (ThermoFisher) con una relación 5×10^6 células/ml de tampón de lisis, según las indicaciones del fabricante. Se incubaron durante 5-10 minutos en hielo y seguidamente se centrifugaron durante 10 minutos a 14000 xg a 4°C para descartar los restos celulares. Se recogieron los sobrenadantes, se tomó una alícuota para analizar y se almacenaron a -20°C. La concentración de proteínas totales se determinó tal y cómo se indica en el Apartado 4.3.1.

4.3.2.2. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE

La separación de proteínas en función de su peso molecular se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con 0,1% de SDS, detergente aniónico que se une específicamente a las proteínas y les confiere una relación tamaño/carga constante. Se trata de una técnica empleada para la separación y visualización de proteínas durante y tras la purificación de las mismas, y tras su extracción a partir de lisados celulares como se describía en el Apartado 4.3.2.1. La composición, tanto del gel concentrador o “stacking” (Anexo I), como del gel separador o “resolving” (Anexo I), se muestran en la Tabla 4.3.

	Stacking 4%	Resolving 12%
dH ₂ O	3 ml	3,4 ml
30% Acrilamida	670 µl	4 ml
Resolving	-	2,5 ml
Stacking	1,3 ml	-
10% SDS	50 µl	50 µl
10% APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Tabla 4.3.- Composición de los geles de electroforesis al 12%.

Previamente a realizar la electroforesis, se añadieron 5 µl de tampón de carga lisis 3X (Anexo I) sobre 10 µl de cada una de las muestras y se incubaron en un baño seco durante 5 minutos a 100°C. Se utilizó un marcador de pesos moleculares Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoFisher) y la electroforesis se realizó en tampón “running” (Anexo I) a un amperaje constante de 20 mA/gel y un voltaje de 180 V durante 60-90 min. Finalmente, para la visualización de las bandas se llevó a cabo una tinción con azul de Coomassie y posterior decoloración con una solución decolorante (Anexo I).

4.3.2.3. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (del inglés, “Polyvinylidene Fluoride”) (GE Healthcare), pre-incubadas durante 30 segundos en metanol. El proceso se llevó a cabo en un equipo de transferencia semi-seca de BioRad utilizando un tampón de transferencia (Anexo I) bajo las condiciones de 20 V y 400 mA durante 55 minutos.

4.3.2.4. Análisis de proteínas por inmunoblot (Western Blotting)

Las proteínas celulares fijadas en las membranas de PVDF se analizaron con sus anticuerpos específicos (Tabla 4.4.). Previamente, y una vez terminada la transferencia, la membrana se bloqueó con el tampón SEA BLOCK Blocking Buffer (ThermoFisher) durante 60 minutos. Seguidamente, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con agitación suave en presencia del anticuerpo específico para detectar la proteína deseada. Finalizada la incubación, se desechó la solución con el anticuerpo y la membrana se lavó 3 veces durante 10 minutos con agitación moderada utilizando SEA BLOCK Blocking Buffer al 10%. Seguidamente, las

MATERIALES Y MÉTODOS

membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora a RT y con agitación suave. Transcurrido este tiempo, la solución del anticuerpo secundario se eliminó y de nuevo se lavó la membrana 3 veces durante 10 minutos en agitación moderada con SEA BLOCK Blocking Buffer al 10%. La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante captación de la señal infrarroja. Las membranas se escanearon en el equipo ODYSSEY CLx (LI-COR). Para la dilución de los anticuerpos primarios y secundarios se utilizó el tampón SEA BLOCK Blocking Buffer.

ANTICUERPO	CONCENTRACIÓN	CASA COMERCIAL
Anti-GzmA (policlonal de ratón hecho en rata)	1/100	-
Anti-GFP	1/1000	Sigma
IRDYE® 680RD	1/20000	LI-COR
IRDYE® 800CW	1/20000	LI-COR

Tabla 4.4.- Anticuerpos primarios y secundarios empleados para Western-Blot.

4.3.3. Análisis de proteínas mediante citometría de flujo

4.3.3.1. Análisis de proteínas extracelulares

El análisis de la presencia de determinadas proteínas de membrana mediante citometría de flujo se realizó con anticuerpos conjugados con fluorocromos (Anexo II). Para ello, 10^5 - 10^6 células se incubaron en una placa de 96 pocillos en 50-100 μ l de PBS suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB, Sigma) durante 15 minutos a 4°C en oscuridad, con la cantidad de anticuerpo indicada por la casa comercial o la combinación de algunos de ellos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 3000 xg durante 2 minutos para retirar la solución de marcaje y se lavaron con PBS suplementado con 5% de SFB para su posterior análisis por citometría de flujo (Beckman Coulter Gallios™). En los casos en los que no se hizo el análisis inmediatamente, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 1% a 4°C hasta 24 h después.

4.3.3.2. Análisis de proteínas intracelulares

La gzmA es una proteína intracelular contenida en los gránulos citotóxicos. Para analizar su expresión, 10^5 células se fijaron durante 15 min a 4°C con 200 μ l de PFA al 1% en PBS. A continuación, se lavaron 2 veces con PBS suplementado con 5% de SFB y se resuspendieron en

100 μ l de una solución de permeabilización que contiene el anticuerpo que reconoce a la gzmA (anti-GzmA PE; del inglés, "Phycoerythrin"; dilución 1/1000; Miltenyi Biotec). Como control se usó el isotipo IgG1 de ratón hecho en cabra conjugado con PE (dilución 1/1000). Se incubaron las células con el anticuerpo y el isotipo durante 1 hora a RT. Para finalizar, las células se lavaron 2 veces con el tampón de permeabilización y se resuspendieron en PFA al 2% para su posterior análisis por citometría de flujo.

4.3.3.3. Análisis de los parámetros de muerte celular

La determinación de la permeabilidad de la membrana en las células, señal característica de muerte celular, se realizó a través del marcaje con 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD), molécula fluorescente que se une al ADN intercalándose en la doble cadena. Para ello, las células se sembraron a una densidad de 10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, se centrifugaron a 3000 xg durante 2 minutos y se resuspendieron en 100 μ l de PBS que contenían 1,5 μ l de 7-AAD (BD; λ_{abs} = 540 nm, λ_{em} = 654 nm). Transcurridos 15 minutos en oscuridad a RT, se centrifugaron de nuevo a 3000 xg durante 2 minutos para retirar la solución de marcaje y se lavaron con PBS para realizar su posterior análisis por citometría de flujo. En los casos en los que no se hizo el análisis inmediatamente, las células fueron fijadas con PFA al 1% a 4°C hasta 24 h después.

4.3.4. Análisis de proteínas por ELISA

4.3.4.1. Cuantificación de citocinas por ELISA

Para cuantificar los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivos o en los explantes de tejido, se utilizaron los correspondientes Kits "Ready-Set-Go" de Affymetrix (eBioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante.

De forma general, se adicionaron 100 μ l del anticuerpo de captura a la concentración recomendada, en tampón de revestimiento, a la placa de ELISA (del inglés, "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay") de 96 pocillos (NUNC Maxisorp) y se incubó toda la noche a 4°C. Se lavó la placa 3 veces con 200 μ l de solución de lavado (Anexo I) y seguidamente se bloqueó con 200 μ l de tampón de ensayo durante 1 hora a RT. Se adicionaron el patrón y el blanco como recomienda el fabricante, además de las muestras diluidas en tampón de ensayo, y se incubaron durante 2 horas a RT. Tras lavar la placa 3 veces con solución de lavado, se adicionaron 100 μ l del anticuerpo de detección conjugado con biotina a la concentración recomendada y se incubó 1

MATERIALES Y MÉTODOS

hora a RT. Se lavó la placa 3 veces con solución de lavado, se adicionaron 100 µl de enzima avidina-HRP (1:4000 en tampón de ensayo) y se incubó durante 30 minutos. Seguidamente, se lavó la placa 5 veces y se adicionaron 100 µl de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina), tras 15 minutos se detuvo la reacción adicionando 50 µl de 1M H₂SO₄. Finalmente, se determinó la absorbancia en un lector de placas a 450/570 nm (Abs 450-Abs 570).

4.3.4.2. Cuantificación de granzima A por ELISA

Para cuantificar la mGzmA a partir de proteínas totales o en suero, se realizó un ELISA tipo sándwich indirecto usando anticuerpos contra la mGzmA hechos en rata y conejo. Estos anticuerpos fueron previamente producidos inmunizando ratas o conejos, siguiendo protocolos convencionales. Como anticuerpo de captura se utilizó IgG de conejo purificado a 2 µg/ml, en NaHCO₃ pH9.6. Como anticuerpo de detección se utilizó el inmunosuero policlonal de rata diluido en PBS (1: 1000). Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo contra IgG de rata hecho en cabra (Sigma) conjugado con HRP y diluido en PBS (1: 20000). Finalmente, se determinó la absorbancia en el lector de placas a 450/570 nm (Abs 450-Abs 570).

Para cuantificar la hGzmA en las muestras de pacientes, se utilizó el Human Granzyme A DuoSet ELISA kit (R&D Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante, procedimiento similar al descrito en el Apartado 4.3.4.1.

4.3.4.3. Cuantificación de proteínas mediante tecnología multiplex

Para la cuantificación de las citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10 y de las quimiocinas CXCL1, CXCL2, CXCL5 y CCL2, se utilizó la tecnología Luminex® utilizando el kit ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay (ThermoFisher) siguiendo las indicaciones del fabricante. Esta tecnología se basa en un conjunto de bolitas con un código de color diferente asignado a cada una de ellas. Cada tipo de bolita a su vez se conjuga con un reactivo específico para cada analito de interés, permitiendo cuantificar de manera simultánea varios de ellos.

Inicialmente, tras la adición de las bolitas magnéticas a la placa de 96 pocillos y la realización de los correspondientes lavados, utilizando Wash Buffer y una base imantada, se añadieron las muestras diluidas ½ en medio RPMI 1640 (PAN Biotech GmbH) en un volumen final de 50 µl y se dejaron incubar durante toda la noche a 4°C siempre en agitación suave. Pasado este tiempo, se añadieron 25 µl del anticuerpo de detección y se incubó durante 30 minutos a

RT. A continuación, tras varios lavados, se añadieron 50 µl de estreptavidina-PE y de nuevo se incubó durante 30 minutos a RT. Finalmente, tras lavar la placa, las bolitas se resuspendieron en 120 µl de Reading Buffer y pasados 5 minutos a RT se procedió a su lectura utilizando el equipo LABSCAN 200™ del Servicio de Separación Celular y Citometría del CIBA.

4.4. Cultivos celulares

4.4.1. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas a lo largo de este trabajo fueron:

LÍNEA CELULAR	DESCRIPCIÓN
HeLa	Cáncer de cérvix uterino humano.
B16	Melanoma de origen murino de la cepa C57BL/6 (H-2b).
X-63Ag8653	Mieloma murino transfectado con un plásmido que produce el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF; del inglés, "Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor") ⁴²⁷ . Esta línea fue cedida por el Dr. G. Stockinger del National Institute for Medical Research de Londres.
L929	Fibroblastoma de ratón de estirpe C3H (H-2k) que secreta factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF; del inglés, "Macrophage Colony Stimulating Factor"), responsable de la proliferación y diferenciación de progenitores mieloides en células del linaje macrófagos y monocitos (Health Protection Agency, cat. 85011425). Esta línea fue cedida por el Dr. José Antonio Enríquez de la Universidad de Zaragoza.

Tabla 4.5.- Líneas celulares.

4.4.2. Mantenimiento de los cultivos celulares

Para la manipulación en condiciones de esterilidad de las líneas celulares se utilizó una campana de flujo laminar vertical. Todo el material utilizado fue esterilizado en un autoclave y las disoluciones añadidas a los cultivos fueron filtradas, usando filtros con un tamaño de poro de 0,22 µm.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para las líneas B16 y HeLa se empleó medio DMEM (Sigma) suplementado con 10% (v/v) de SFB, 2mM GlutaMAX (Gibco) y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml, Sigma) referido como "DMEM completo"; la línea L929 se cultivó con DMEM suplementado con 10% de suero inactivado por calor y 2mM GlutaMAX; la línea X63Ag8653 se mantuvo en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero inactivado por calor, 2mM GlutaMAX y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml y geneticina 1 mg/ml, Sigma).

Para el cultivo rutinario de las diferentes líneas celulares, se utilizaron frascos de cultivo de 25 y 75 cm² (Nunc) con tapón con filtro, en un volumen máximo aproximado de unos 5-15 ml y 20-40 ml respectivamente, y un incubador termostático a 37°C, en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂. Una vez alcanzadas las densidades de saturación en estas condiciones, se establecieron subcultivos derivados de los iniciales.

Para las líneas adherentes, las células se despegaron mediante incubación con una solución de tripsina-EDTA 1X (Sigma) a 37°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, con el fin de inactivar la tripsina, se añadieron 5 ml de medio fresco suplementado con SFB, y las células se transfirieron a tubos de fondo cónico para determinar así el número de células y su viabilidad mediante la tinción por exclusión con azul de tripán. A continuación, el volumen obtenido se centrifugó durante 5 minutos a 335 xg, se eliminó el sobrenadante y las células se sembraron en medio fresco o bien se utilizaron para llevar a cabo los diferentes experimentos.

Para las líneas en suspensión, se recogió el sobrenadante con el objetivo de realizar el recuento y determinar su viabilidad y posteriormente se centrifugó siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para las células adherentes.

4.4.3. Determinación de la densidad y viabilidad celular

La determinación de la densidad y la viabilidad celular se realizó mediante tinción con azul de tripán, colorante capaz de penetrar en las células muertas, las cuales tienen la membrana plasmática dañada, tiñéndolas de color azul. Mientras, las células vivas que mantienen la integridad de la membrana plasmática no incorporan el colorante.

Para el recuento se mezclaron 50 µl de una determinada suspensión celular homogeneizada y 50 µl de solución estéril azul de tripán (al 0,4% en 0,15M NaCl), la mezcla se colocó sobre un hemocitómetro o cámara de Neubauer y se realizó el recuento celular en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E100).

La densidad celular se determinó contando un número de cuadrantes completos de la cámara hasta alcanzar como mínimo 100 células totales (viables y no viables) y se calculó como el número de células viables dividido entre el número de cuadrantes y multiplicado por la dilución de la suspensión celular y por 10^4 , derivado del ajuste al tamaño de la cámara.

La viabilidad celular se determinó considerando el porcentaje de células viables respecto al número total de células. Todos los experimentos se realizaron con una viabilidad celular inicial $\geq 90\%$.

4.4.4. Determinación de la proliferación celular

Se utilizó el test colorimétrico diseñado por Mosmann ⁴²⁸ para determinar la proliferación celular tras el tratamiento con nanomateriales. Este método relaciona el número de células viables con la cantidad de cristales de azul formazán insolubles en medio acuoso, producidos por la oxidación del colorante soluble MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, Sigma) llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Los resultados de este método permiten determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, dando una idea de la disminución de la supervivencia y proliferación celular, ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de azul de formazán producido.

Para ello, las células se cultivaron a una densidad de 10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, con un volumen final de $100\mu\text{l}$ /pocillo y al menos por triplicado, en ausencia o presencia de nanomateriales. El cultivo se incubó aproximadamente 4 horas, y a continuación se añadió a cada pocillo $10\mu\text{l}$ de la disolución de MTT (5 mg/ml en PBS) con una pipeta de repetición. La placa se incubó durante aproximadamente 2 horas a 37°C y posteriormente se centrifugó durante 20-30 minutos a 524 xg. Se eliminó el sobrenadante de los pocillos por inversión rápida y enérgica de la placa sobre papel. Los cristales de formazán formados se disolvieron añadiendo a cada pocillo $100\mu\text{l}$ de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Se midió la absorbancia de los pocillos a 540 nm en un lector de placas frente a los blancos apropiados (medio de cultivo sometido al mismo procedimiento que los cultivos celulares). Los resultados se presentan como porcentaje de viabilidad de las células expuestas a las distintas concentraciones de nanomateriales, frente al control de células sin tratar.

4.4.5. Separación de células en gradiente de densidad

La separación de células en gradiente de densidad con el fin de eliminar las células muertas se realizó en aquellos cultivos celulares donde tras la determinación de la viabilidad celular esta era $< 90\%$. Para ello, un determinado volumen de células fue añadido sobre un volumen equivalente de la solución de extracción Histopaque® 1077 (Sigma), con cuidado de no mezclar ambas fases. A continuación, se centrifugó a 524 xg durante 20 minutos sin freno y posteriormente se recuperó el anillo formado en la interfase correspondiente a las células vivas, el cual fue puesto de nuevo en cultivo adicionando medio de cultivo fresco.

La separación de células en gradiente de densidad con el fin de obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMCs; del inglés, "Peripheral Blood Mononuclear Cells") se realizó utilizando la sangre procedente de *buffy coats* diluida 1/5 en PBS estéril. Esta misma dilución se añadió, con cuidado de no mezclar las fases, sobre un volumen de la solución de extracción Histopaque® 1077 en proporción 1:1, se centrifugó a 524 xg durante 30 minutos sin freno, y posteriormente se recuperó el anillo de PBMCs localizado en la interfase (Figura 4.3.). Tras centrifugar a 524 xg durante 5 minutos para retirar el plasma y los restos de la solución de extracción, se lisaron los glóbulos rojos con 2 ml de tampón de lisis (Anexo I) durante 5 minutos a RT. Finalmente, las PBMCs purificadas se lavaron 3 veces con PBS estéril y se utilizaron recién aislados.

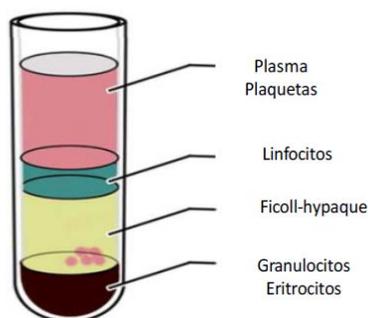


Figura 4.3.- Imagen ilustrativa del resultado final obtenido a partir de la técnica de separación de linfocitos de sangre periférica. A través de la solución de extracción Histopaque® 1077 se pueden obtener distintas capas correspondientes a cada uno de los tipos celulares presentes en sangre periférica en función de su diferente densidad.

4.4.6. Congelación y descongelación de las líneas celulares

Para la congelación, las células fueron crecidas hasta su máxima confluencia, se tomaron alícuotas de aproximadamente 10^6 - 10^7 células que tras ser centrifugadas a 335 xg durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en 1 ml del medio de cultivo al 10% de DMSO como agente crioprotector y se trasvasaron a criotubos (Nunc) de congelación estériles. Los viales se congelaron a -80°C durante 24-72 horas y posteriormente en nitrógeno líquido, donde se almacenaron a largo plazo hasta su uso.

Para la descongelación, el criotubo se dejó atemperar y a medida que se descongelaba, se procedió a la adición gradual de un pequeño volumen de medio de cultivo fresco en el interior del criotubo, mientras la suspensión celular se iba trasvasando a un tubo cónico preparado previamente con 10 ml de este mismo medio. Las células se centrifugaron a 335 xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió nuevamente en 5 ml de su medio de cultivo para realizar el recuento y determinar su viabilidad. Finalmente, se estableció el cultivo a la densidad celular deseada bajo las condiciones descritas anteriormente (Apartado 4.4.2.).

4.4.7. Detección y eliminación de *Mycoplasma* en cultivos celulares

Para la detección, las posibles contaminaciones fueron analizadas de forma rutinaria mediante el ensayo de actividad enzimática de las 6 principales cepas de *Mycoplasma* que contaminan los cultivos celulares y no se encuentran presentes en células eucariotas, basado en una reacción bioquímica luminiscente del ATP. Para ello, se recogió el sobrenadante de las células de interés tras 48 horas en cultivo, se centrifugó a 524 xg durante 10 minutos para eliminar los restos celulares y se entregó a los servicios científico-técnicos del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) para su análisis mediante el Kit MycoAlert Mycoplasma (Lonza).

Para la eliminación, se utilizó una combinación de dos antibióticos del kit BM Cyclin (Roche), BM-Ciclina 1 derivado de pleuromutilina ($4\ \mu\text{l/ml}$, $10\ \mu\text{g/ml}$) y BM-Ciclina 2 derivado de tetraciclina ($4\ \mu\text{l/ml}$, $5\ \mu\text{g/ml}$), mediante un suministro alterno de 3 y 4 días respectivamente, hasta alcanzar un periodo de 3 semanas. A su vez, los días correspondientes a la adición de los diferentes antibióticos, las células se sembraron en medio de cultivo fresco. Finalmente, tras haber completado el tratamiento descrito, los cultivos celulares volvieron a ser testados para comprobar la efectividad del tratamiento.

4.4.8. Inactivación por calor del complemento en el suero fetal bovino

Para algunos de los experimentos realizados, fue preciso llevar a cabo la inactivación por calor del SFB para prevenir la lisis de las células por las proteínas del sistema del complemento. Para ello, el SFB se trató durante 30 minutos a 56°C en un baño de agua y, transcurrido este tiempo, se centrifugó a 3000 xg durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante obtenido para su uso.

4.4.9. Generación de sobrenadantes de células X-63Ag8653

Para la generación de DCs derivadas de médula ósea (BMDCs; del inglés, “Bone Marrow Derived Dendritic Cells”) se utilizó el sobrenadante de las células X-63Ag8653 como fuente de GM-CSF. Para su obtención, las células se mantuvieron tal y como se describe en el Apartado 4.4.2. hasta alcanzar una densidad celular de 60×10^6 células. A continuación, se centrifugaron a 335 xg durante 5 minutos para retirar el medio con geneticina y se resuspendieron 15×10^6 células en 50 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 5% de suero inactivado por calor, 2mM GlutaMAX y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml). Las células se cultivaron durante 48 horas hasta confluencia, se centrifugaron durante 5 minutos a 335 xg y el sobrenadante se transfirió a un tubo de fondo cónico de 50 ml para su congelación a -20°C.

4.4.10. Generación de sobrenadantes de células L929

Para la generación de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs; del inglés, “Bone Marrow Derived Macrophages”) se utilizó el sobrenadante de las células L929 como fuente de M-CSF. Para ello, las células se sembraron a una densidad celular de $4,7 \times 10^5$ células en un frasco de 75 cm² con 50 ml de medio DMEM suplementado con 10% de suero inactivado por calor, 2mM GlutaMAX y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml). Tras 7 días en cultivo, el sobrenadante fue filtrado para eliminar restos utilizando un filtro estéril de 22 µm y congelado a -20°C hasta su posterior uso.

4.4.11. Extracción de progenitores hematopoyéticos a partir de médula ósea

Para la obtención de células a partir de médula ósea, se utilizaron ratones de fondo genético C57BL/6 a los que, tras ser sometidos a eutanasia en cámara de CO₂, se les extrajeron

las extremidades posteriores y se les retiró cuidadosamente la piel y el músculo. A continuación, para trabajar en condiciones asépticas, se lavaron con etanol al 70% y rápidamente se traspasaron a medio RPMI 1640 para evitar disminuir la viabilidad celular. Se eluyeron las células introduciendo medio RPMI 1640 a través de la cavidad de la médula ósea, se homogeneizó la suspensión celular así obtenida y se filtró utilizando un filtro de nylon estéril de 70 μm . Posteriormente, se lisaron los eritrocitos con la solución RBC Lysis Buffer (Alfa Aesar, ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante, se centrifugó a 335 xg durante 5 minutos y las células remanentes se resuspendieron en el medio adecuado para su diferenciación.

4.4.12. Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea

Las células obtenidas a partir de médula ósea, se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, 2mM GlutaMAX y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), referido como "RPMI completo", y medio de diferenciación GM-CSF, a una densidad celular de 10^6 células/ml en un volumen de 10 ml en placas de cultivo de 90 mm. A día 3, se adicionaron otros 10 ml de medio fresco. A día 5, se recogió la mitad del sobrenadante para ser centrifugado a 335 xg durante 5 minutos, resuspendiendo las células en 10 ml de medio fresco y homogeneizando con el resto de sobrenadante en su respectiva placa de cultivo. A día 7, las BMDCs obtenidas estaban completamente diferenciadas, mostrando un fenotipo $\text{CD11b}^+\text{CD11c}^+$ analizado mediante citometría de flujo (Apartado 4.3.3.1.), por lo que se resuspendieron en RPMI 1640 completo en una placa de 96 pocillos a una densidad celular adecuada para su utilización en experimentación.

4.4.13. Generación de macrófagos derivados de médula ósea

4.4.13.1. Generación de macrófagos con fenotipo M1 (GM-BMDMs)

Las células obtenidas a partir de médula ósea, se resuspendieron en medio RPMI completo y medio de diferenciación GM-CSF, a una densidad celular de 10^6 células/ml en un volumen de 10 ml en placas de cultivo de 90 mm. A día 3, las placas se lavaron 2-3 veces con PBS y se adicionaron 10 ml de medio fresco. A día 6, las placas se lavaron 2-3 veces con PBS y se adicionaron 10 ml de medio fresco. A día 8, las placas se volvieron a lavar 2-3 veces con PBS, las células se tripsinizaron durante 20-30 minutos a 37°C y, con la ayuda de un rascador de células (Nunc) fueron despegadas. Se recogieron las células, se centrifugaron a 335 xg durante 5 minutos

MATERIALES Y MÉTODOS

y una vez eliminado el sobrenadante, se resuspendieron en RMPI 1640 completo en una placa de 96 pocillos a una densidad celular adecuada para su utilización tras 24 horas en experimentación. A día 9, los GM-BMDMs obtenidos estaban completamente diferenciadas mostrando un fenotipo CD11b⁺F4/80⁺MHCII⁺ analizado mediante citometría de flujo (Apartado 4.3.3.1.).

4.4.13.2. Generación de macrófagos con fenotipo M2 (BMDMs)

Las células obtenidas a partir de medula ósea, a una densidad celular de 10⁶ células/ml, se resuspendieron en 10 ml de medio RMPI completo y medio de diferenciación M-CSF en placa de cultivo de 90 mm. A día 3, las placas se lavaron 2-3 veces con PBS y se adicionaron 10 ml de medio fresco junto con 10 ng/ml de mouse IL-4 (Miltenyi Biotec). A día 6, las placas se volvieron a lavar 2-3 veces con PBS y las células se tripsinizaron durante 20-30 minutos a 37°C y, con la ayuda de un rascador de células, fueron finalmente despegadas. Se recogieron las células, se centrifugaron a 335 xg durante 5 minutos y una vez eliminado el sobrenadante, se resuspendieron en RMPI 1640 completo en placa de 96 pocillos a una densidad celular adecuada para su utilización tras 24 horas en experimentación. Al cabo de 7 días, los BMDMs estaban completamente diferenciados, mostrando un fenotipo CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ analizado mediante citometría de flujo (Apartado 4.3.3.1.).

4.5. Transfección de células

4.5.1. Transfección transitoria del vector pBABE

La transfección transitoria del vector pBABE se realizó de manera rutinaria en la línea celular adherente HeLa. Se utilizó Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen), reactivo basado en la transfección mediada por lípidos catiónicos. Siguiendo las indicaciones del fabricante, las células se sembraron a una densidad adecuada de manera que tras 24 horas de la siembra estas se encontraran a una confluencia de alrededor el 80% para garantizar una buena transfección y minimizar la citotoxicidad. Además, el medio de cultivo de estas células no contenía antibióticos como recomienda el fabricante, para evitar la posible toxicidad inducida por estos al aumentar la permeabilidad de las células durante el proceso de transfección. La relación ADN:Lipofectamina fue optimizada en un trabajo previo de nuestro laboratorio, empleándose 1 µg ADN:3 µl Lipofectamina. La cantidad de vector a transfectar en función del número de células mantiene un compromiso entre una expresión no demasiado elevada para evitar interacciones

inespecíficas, pero si lo suficiente como para poder detectarla. De este modo la relación en la transfección fue de 300 ng de cada vector/ 10^6 células. La dilución de los vectores y de la Lipofectamina se realizó en Opti-MEM Reduced Serum Medium (Invitrogen). Tras 1 hora de incubación a RT, la mezcla de ADN con Lipofectamina se añadió a las células gota a gota. Unas 24 horas después se procedió a su análisis mediante citometría de flujo (Apartado 4.3.3.2) y microscopia invertida de fluorescencia (Apartado 4.6.1.).

4.5.2. Separación celular por citometría de flujo y dilución límite para la obtención de líneas transfectantes estables

Cuando el objetivo fue obtener líneas estables que tuvieran un nivel de sobreexpresión homogéneo de la proteína de interés, inicialmente se llevó a cabo una selección de las células GFP positivas mediante separación celular por citometría de flujo o *Cell Sorting* con el equipo FACS Aria (BD) en el Servicio de Separación Celular y Citometría del CIBA. Las células se recogieron en tubos de fondo cónico que contenían 10 ml de medio DMEM completo y seguidamente se colocaron en cultivo para su recuperación.

Posteriormente, se llevó a cabo una dilución límite que permitiera la elección de un clon concreto de células. Para eso, en 30 ml del medio condicionado correspondiente (medio de cultivo completo de la misma línea celular tras 24 horas de crecimiento) se añadieron 150 células y se sembraron 100 μ l/pocillo sobre 3 placas de 96 pocillos. De esta manera se consigue que en algunos pocillos quede una sola célula que podrá comenzar a dividirse gracias a los factores de crecimiento y citocinas que contiene el medio condicionado. Tras unas 3 semanas aproximadamente, se comenzaron a seleccionar algunos clones fluorescentes a los que se les añadió más medio completo, los cuales se fueron expandiendo en pocillos de mayor tamaño hasta obtener una cantidad suficiente de cultivo para analizar la sobreexpresión de las proteínas de interés mediante Western-Blot (Apartado 4.3.2.), citometría de flujo (Apartado 4.3.3.) y microscopia invertida de fluorescencia (Apartado 4.6.1.).

4.6. Microscopia de fluorescencia

4.6.1. Microscopia convencional de fluorescencia

La observación de las muestras se realizó directamente sobre las placas de cultivo con un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX81). Estos equipos estaban provistos de un sistema de fotografía digital, las cuales se analizaron con el programa ImageJ y AdobePhotoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated).

4.6.2. Microscopia confocal

Las células fueron sembradas a una densidad de 2×10^5 células en 1 ml de RPMI completo sobre cubreobjetos (13 mm) colocados en el interior de una placa de 24 pocillos. Una vez adheridas, estas fueron incubadas con los nanomateriales durante 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se realizaron múltiples lavados con PBS para eliminar todos aquellos restos de cápsulas no internalizadas y se fijaron con PFA 4%. Posteriormente, se recuperaron los cubreobjetos de los pocillos y se colocaron con la cara que contenía las células adheridas en portaobjetos sobre una gota de Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates, Inc) que contenía 20 µg/ml de Hoechst33342 (Invitrogen), colorante fluorescente de ADN empleado para el marcaje de los núcleos. La conservación de las preparaciones se realizó a 4°C hasta su visualización en un microscopio confocal (Olympus FV10i Oil Type). Para el procesado de imágenes en cuanto a la eliminación del ruido de fondo y la superposición de los distintos canales de fluorescencia, se utilizó el software FV101-SW.

4.7. Ratones

4.7.1. Modelos animales

Para los experimentos realizados en esta tesis doctoral, tanto *in vivo* como *ex vivo*, se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 o WT de entre 5 y 7 semanas de edad, procedentes de Harlan Laboratories o de la colonia estable mantenida en el animalario del CIBA, cuyo haplotipo para MHC-I es H2Kb/Db (H-2b). En algunos experimentos se utilizaron ratones C57BL/6

deficientes en algunas proteínas del sistema inmunitario: $gzmA^{-/-}$ y $gzmK^{-/-}$. Todos ellos procedentes del laboratorio del Dr. Markus Simon del Max Planck Institute of Immunobiology en Friburgo, Alemania.

Los ratones se mantuvieron y criaron en condiciones libres de patógenos, con alimentación y agua “*ad libitum*”, en el animalario del CIBA. Su fenotipo fue analizado periódicamente mediante PCR a partir de ADN genómico.

Todos los experimentos llevados a cabo con ratones se realizaron de acuerdo con los procedimientos de experimentación PI64/17 aprobados y bajo la supervisión del Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. El cuidado y uso de los animales se realizó de acuerdo con la Política Española de Protección Animal RD53/2013, la cual reúne la Directiva de la Unión Europea 2010/63 en relación a la protección de los animales utilizados para fines científicos y experimentales.

4.8. Experimentación *in vivo* y *ex vivo*

4.8.1. Generación *in vivo* de linfocitos Tc mediante la infección con LCMV

Para la realización de algunos experimentos llevados a cabo a lo largo de esta tesis doctoral, se utilizaron CTLs generados *in vivo* para la cepa WE del virus de la linfocoriomeningitis de ratón (LCMV; del inglés, “Lymphocytic Choriomeningitis Virus”) de acuerdo con los protocolos establecidos ⁴²⁹. Para la obtención de estas células, los ratones fueron inoculados por vía intraperitoneal (i.p.) con 10^5 unidades formadoras de placa (pfu, “plaque forming unit”) del virus LCMV-WE en 200 μ L de RPMI 1640 suplementado con 2% de suero inactivado por calor. Tras 8 días, los ratones infectados fueron sacrificados en cámara de CO₂ para la extracción de los bazos y el aislamiento de los esplenocitos. Para ello, el bazo una vez extraído, fue disgregado utilizando un émbolo de una jeringuilla estéril sobre una placa de Petri hasta obtener una suspensión celular, filtrado mediante un filtro de nylon de 70 μ m y transferido a un tubo de fondo cónico de 50 ml. A continuación, tras lisar los eritrocitos con la solución RBC Lysis Buffer, los esplenocitos se centrifugaron a 335 xg durante 5 minutos y se resuspendieron en tampón MACS (Anexo I) para la separación de los CTLs.

4.8.2. Separación de poblaciones celulares mediante MACS

Para separar las células de interés, se utilizaron anticuerpos unidos a microesferas magnéticas, las cuales fueron posteriormente seleccionadas por MACS (del inglés, “Magnetic-Activated Cell Sorting”), es decir, columnas metálicas colocadas en el interior de un campo magnético (Separador inmunomagnético MACS®; Miltenyi Biotec). La selección puede ser positiva, es decir, las células de interés son las que se unen al anticuerpo y por lo tanto son aquellas retenidas en la columna; o negativa, cuando recogemos las células eluidas eliminando de esta forma un tipo celular específico. En nuestro caso, realizamos una selección positiva para la selección de los CTLs.

La población de células mixta obtenida a partir del bazo, fue resuspendida en tampón MACS en una proporción de 90 μ l por cada 10^7 células en combinación con 10 μ l del anticuerpo anti-CD8a unido a microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec). Tras 10 minutos de incubación a 4°C, y después de 2-3 lavados con tampón MACS, se llevó a cabo la separación en columnas LS (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante.

4.8.3. Inducción de sepsis mediante la infección con *E. coli*

Se aisló una cepa de *E. coli* a partir de la sangre de ratones WT tras someterse 24 horas a sepsis inducida mediante el procedimiento de punción de ligadura cecal (CLP; del inglés, “Cecal Ligation and Puncture”) y se almacenó a -80°C en medio LB que contenía un 10% de glicerol. Para preparar el inóculo, la cepa de *E. coli* se cultivó en un medio LB a 37°C hasta la fase de crecimiento exponencial y se lavó dos veces con PBS. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro OD600 para estimar el número de bacterias en el cultivo. La densidad bacteriana se ajustó a 1×10^9 bacterias/ml. Se indujo la sepsis a los ratones mediante una inyección i.p. de 2×10^8 bacterias en PBS y después de 24 horas de inducción de la sepsis, se obtuvieron muestras de sangre y plasma que se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

4.8.4. Biodistribución de nanomateriales

Todos los protocolos descritos en este apartado se realizaron en colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Dr. Jesús Martínez de la Fuente del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA).

En todos los casos, se administró un volumen de 100 μl vía oral mediante una sonda gástrica, y tras la finalización del periodo experimental, se sacrificaron los ratones mediante la administración i.p. de 200 μl de pentobarbital sódico (Dolethal) a una concentración letal y se procedió a la toma de imágenes mediante el sistema de imagen IVIS Lumina III (PerkinElmer). A continuación, una vez los animales habían dejado de tener reflejo en las extremidades, se procedió a extraer la sangre y los órganos para su posterior análisis.

- Suero: La sangre se extrajo por inyección intracardiaca, con un 10% de citrato sódico como anticoagulante. Se centrifugó a 2000 xg durante 15 minutos para obtener el suero que se congeló a -80°C hasta su posterior análisis.
- Órganos: Tras su extracción, los órganos se pesaron, se lavaron en PBS para eliminar la sangre y se preservaron para la cuantificación de las NPs mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS; del inglés, “Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”).

ICP-MS: Para determinar la cantidad de oro en los distintos órganos, inicialmente se procedió a congelarlos a -80°C en un volumen mínimo de agua tras varios lavados y posteriormente se liofilizaron (Telstar cryodos) durante toda la noche. Tras llevar a cabo su pesaje, se procedió a quemarlo en un horno de cerámica a 650°C durante 1 hora. Las cenizas resultantes se resuspendieron en 200 μL de agua regia ($3\text{HCl}:1\text{HNO}_3$) y 200 μL de solución piraña ($3\text{H}_2\text{SO}_4:1\text{H}_2\text{O}_2$) y se incubaron a 70°C durante 1 hora para terminar con su digestión completa. Se centrifugaron a velocidad máxima durante 30 segundos y se recogieron los sobrenadantes, los cuales se diluyeron hasta un volumen final de 20 mL en H_2O MilliQ, para ser enviados a la unidad de espectrometría atómica del SCAB (Servicio Central de Análisis de Bizkaia). Para determinar la cantidad de oro en sangre, se procedió de la misma manera exceptuando el quemado en el horno.

4.8.5. Inducción de tumores y análisis del desarrollo tumoral

Se indujeron tumores por vía subcutánea (s.c.) inoculando 5×10^5 células diana en el flanco derecho de los ratones. Se realizó el seguimiento del desarrollo tumoral mediante la determinación del volumen durante los días sucesivos. Para calcular el volumen, el tumor se midió ancho (A), largo (L) y alto (H) y se aplicó la siguiente fórmula: $A * L * H$, considerando como punto final del experimento cuando los tumores habían alcanzado un volumen de $0.5\text{-}1 \text{ cm}^3$ en función del propósito del análisis, o cuando los tumores mostraban algún signo de ulceración.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.8.5.1. Explantes

Tras aplicar el punto final establecido según el experimento, se extirpó el tumor del flanco del ratón, se extrajo la piel, y tras haberlo pesado utilizando una balanza de precisión, se procedió a realizar su cultivo en 1 ml de medio RPMI completo durante 24 horas a 37°C en una placa de 6 pocillos. El desarrollo de este tipo de tumores se asocia a la formación de una cápsula exterior de tejido conectivo que presenta cierta resistencia cuando estos son manipulados, por lo que fue de gran importancia la ruptura de dicha cápsula asegurando la liberación de los mediadores al medio para su posterior análisis, tal y como se describe en el Apartado 4.3.4.

4.8.5.2. Análisis de infiltración intratumoral

Tras aplicar el punto final establecido en función del experimento, se extirpó el tumor del flanco del ratón, se extrajo la piel, y se procedió a la disgregación mecánica de la masa tumoral utilizando el disociador gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) en gentleMACS M Tubes (Miltenyi Biotec). La suspensión celular obtenida se pasó por un filtro de nylon de 100 μm (Falcon), se centrifugó y se lisaron los eritrocitos con la solución RBC Lysis Buffer. El pellet obtenido se lavó dos veces con PBS y se volvió a pasar por un filtro de nylon de 100 μm . Se tomó una alícuota y se determinó la densidad celular mediante azul de tripán. Se utilizaron alícuotas de 10^6 células donde se analizó la expresión de determinados marcadores (Anexo II), tal y como se describe en el Apartado 4.3.3.1.

4.9. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado y los datos obtenidos fueron expresados como la media \pm SEM (del inglés, "Standard Error of the Mean"), empleando el programa GraphPad Prism 4.0. en la mayoría de los casos. El análisis de cada uno de los resultados se describe en los respectivos pies de figura. Para comparar diferencias entre dos grupos se utilizó un t test de Student, mientras que para comparar tres o más grupos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido de comparaciones múltiples. Independientemente del análisis empleado: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Por otro lado, también se realizó un análisis de correlación a través de un test no paramétrico de Spearman. Para cada una de las correlaciones se obtuvo tanto el coeficiente de correlación como el p-valor y se ajustó a un modelo de regresión lineal simple en el que la variable dependiente fue la actividad o la concentración de la gzmA, y la variable explicativa el estado de los paciente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Detección de la actividad de la granzima A mediante el uso de sustratos específicos

5.1.1. Estudio inicial de las sondas seleccionadas

Basándonos en trabajos previos, se seleccionaron dos péptidos de diferentes longitudes que *a priori* deberían de ser procesados tanto por la granzima A humana y como por la de ratón. La secuencia del primer péptido, a partir de ahora denominado como péptido 1 o P1, fue VANRSAS⁴³⁰; mientras que el segundo péptido, péptido 2 o P2, estuvo conformado por la secuencia EDMAKSDKAR²⁵⁴.

Una vez seleccionados los péptidos, estos se funcionalizaron con las sondas FAM y DABCYL, que a su vez permitirán la transferencia de energía dando lugar a la desactivación de la fluorescencia conocida como *quenching*, como método de detección de alto rendimiento (Figura 5.1.). El fluoróforo FAM o carboxifluoresceína, ampliamente utilizado para ensayos biológicos, se caracteriza por tener un coeficiente de extinción molar $\epsilon_{492} = 65,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, que representa la absorbancia en su pico máximo de excitación, y un rendimiento cuántico de fluorescencia $\Phi_F = 0.92$. Mientras, DABCYL o ácido 4-((4-(dimetilamino(fenil)azo)benzoico se seleccionó como quencher de FAM. Se trata de un *Black Hole Quencher* (BHQ) capaz de absorber la energía de excitación del fluoróforo y disipar esta energía en forma de calor, permitiendo así evitar la señal residual de fondo o disminuir la relación señal-ruido común en este tipo de combinaciones.

RESULTADOS

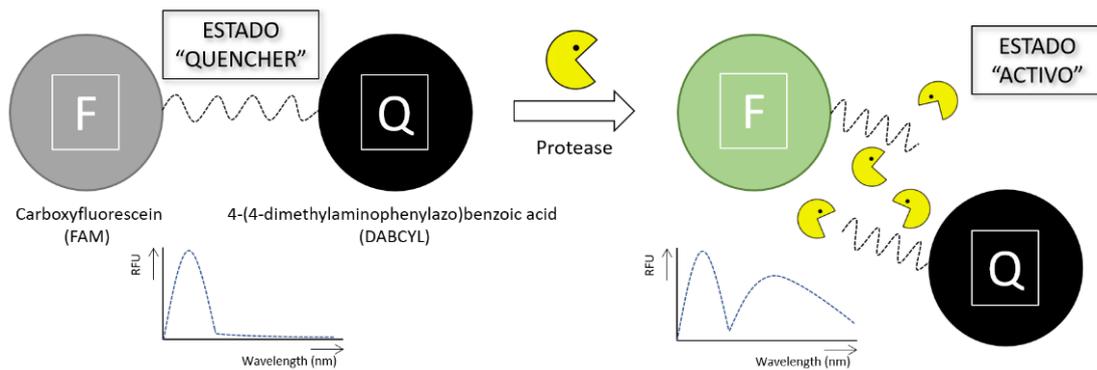


Figura 5.1- Posibles estados en función de la distancia donador-aceptor. Cuando FAM y DABCYL se conjugan al mismo péptido a una distancia limitada, se produce un quencheo eficaz de la emisión de FAM. Sin embargo, cuando los enlaces peptídicos se rompen, la distancia entre FAM y DABCYL aumenta de manera significativa, y como resultado de ello, FAM comienza a emitir. De ahí que podamos encontrar dos posibles estados: “Quencher” o apagado y “Activo” o fluorescente.

En primer lugar, y en base a los espectros teóricos de excitación-emisión determinados para ambas sondas (Figura 5.2.), se establecieron los parámetros de medida óptimos en cuanto a longitudes de onda. Se comprobó que la sonda DABCYL no emitía fluorescencia tras ser excitada a la longitud de onda correspondiente a su máximo. Tras excitar a FAM en su máximo de 492 nm, se observó cómo el pico de excitación enmascaraba el pico de emisión debido a que la cantidad de luz emitida siempre es mucho más pequeña que la que se utiliza para excitar. Por ello, se ensayaron diferentes longitudes cercanas a su máximo, hasta que finalmente se seleccionó la longitud de excitación de 475 nm para experimentos posteriores.

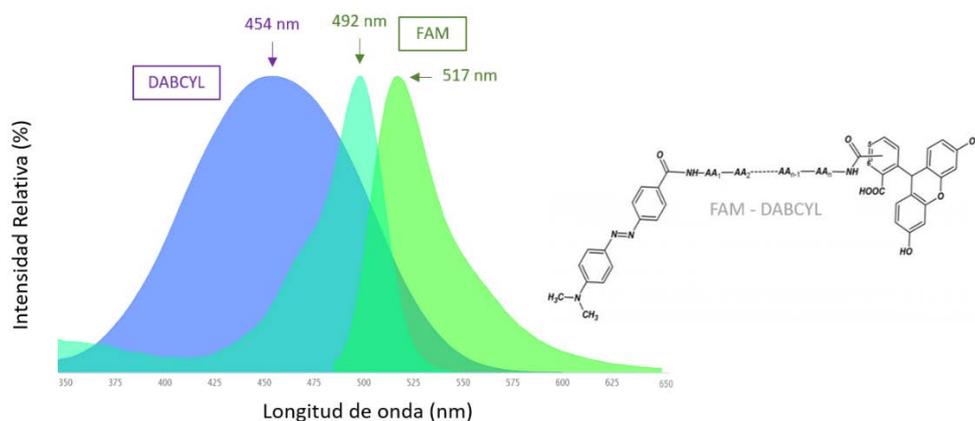


Figura 5.2.- Espectros teóricos de excitación-emisión junto a la estructura molecular de las sondas FAM y DABCYL funcionalizadas en los extremos de una secuencia peptídica. Se seleccionó el fluoróforo FAM funcionalizado en el extremo N-terminal y el quencher DABCYL en el extremo C-terminal de las secuencias peptídicas VANRSAS o P1 y EDMAKSDKAR o P2, descritas en estudios previos por ser específicas para la detección de actividad de la gzmA. Las imágenes de los espectros fueron obtenidas a partir de la aplicación de FPbase y la estructura de las sondas fue proporcionada por la casa comercial Pepsican, encargada de sintetizar y funcionalizar los péptidos.

Asimismo, se determinó la eficiencia de transferencia de energía entre las sondas, dependiente de varios factores entre los que se incluyen la distancia donador-aceptor o el grado de solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor. Para calcular los valores de eficiencia experimental de la transferencia de energía entre FAM y DABCYL, se llevó a cabo una medición de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo en presencia y ausencia del quencher. Como puede verse en la Figura 5.3., DABCYL produjo un quencheo de la fluorescencia de FAM mostrando una disminución de la intensidad con una eficiencia de aproximadamente el 50%.

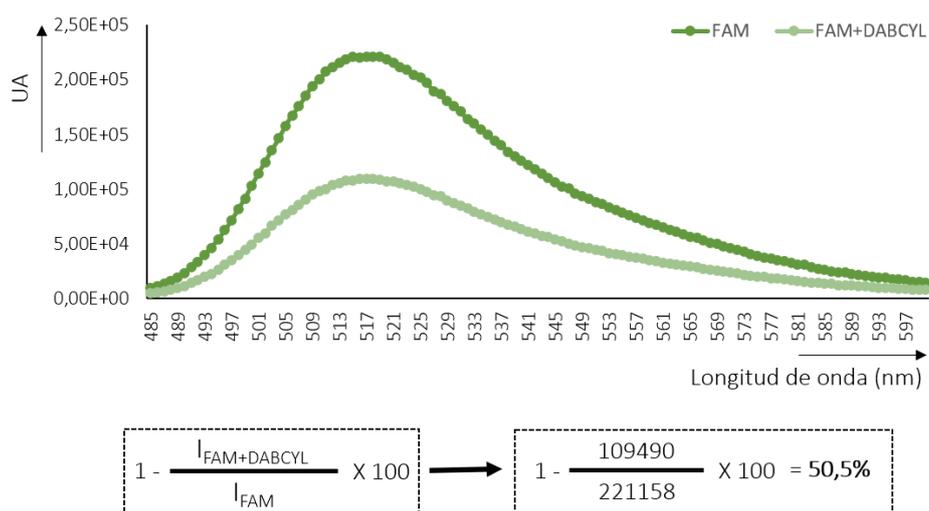


Figura 5.3.- Eficiencia de la transferencia de energía entre FAM y DABCYL. Se preparó una disolución con las sondas seleccionadas, ambas a una concentración final de 1µM en disolución utilizando el tampón 100mM TRIS-HCl pH8.5, en un volumen de reacción de 100 µl en cubeta de cuarzo. Como control, se midió la fluorescencia de FAM en ausencia de DABCYL, a la misma concentración y con el mismo volumen final. Las medidas se llevaron a cabo por duplicado en un espectrofluorímetro. El gráfico representa la media de las curvas de emisión de 2 experimentos independientes tras la excitación a 475 nm.

Tal y como puede observarse en la Figura 5.3., la medición de fluorescencia da lugar a unidades arbitrarias (UA) derivadas del propio método de ensayo. Sin embargo, cuando se realizan ensayos de actividad enzimática, se requiere la determinación de la cantidad de sustrato formado por unidad de tiempo en condiciones definidas (Tª, pH...), es decir, µmoles/min. Para poder llevar a cabo esta conversión en experimentos posteriores, se obtuvieron las ecuaciones derivadas de la regresión lineal simple de FAM a distintos tiempos (Figura 5.4.) y se estableció la relación entre concentración de fluoróforo e intensidad de fluorescencia obtenida. Las diferencias que se observan entre las distintas ecuaciones podrían deberse a una posible degradación del fluoróforo FAM con el transcurso del tiempo bajo las condiciones empleadas.

RESULTADOS

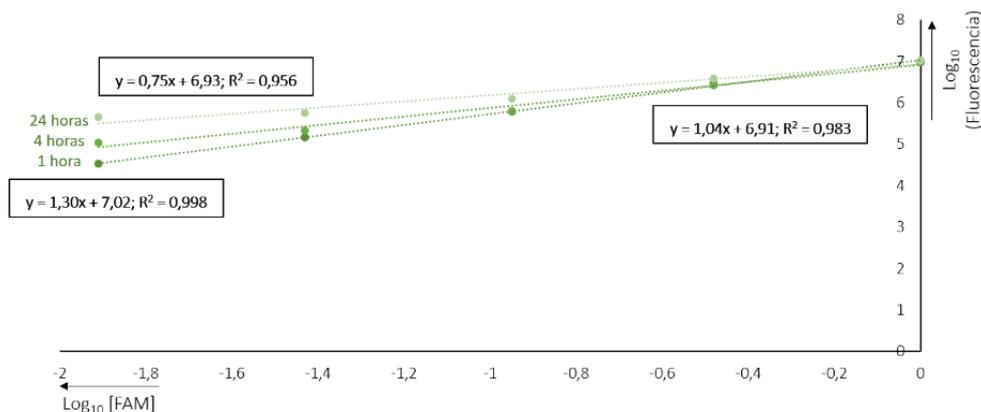


Figura 5.4.- Curvas de calibración de FAM. Partiendo de una concentración inicial de $1\mu\text{M}$ del fluoróforo FAM, se realizaron diluciones seriadas utilizando el tampón 100mM TRIS-HCl pH8.5 en un volumen final de 100 μl en una placa de 96 pocillos. Después de la incubación de las muestras a 37°C en placa calefactora durante diferentes tiempos (1, 4 y 24 horas), se procedió a la lectura de la fluorescencia en cubeta de cuarzo tras la excitación a 475 nm en un espectrofluorímetro. Los valores obtenidos fueron representados en escala logarítmica y mediante una línea de tendencia lineal se obtuvieron las ecuaciones correspondientes.

5.1.2. Estudio de la estabilidad de los péptidos seleccionados

La estabilidad de los péptidos en solución puede llegar a ser bastante limitada, por lo que las casas comerciales recomiendan su almacenaje entre -20°C y -80°C . La temperatura es un factor que genera variaciones en el rendimiento cuántico de la mayoría de las moléculas, puesto que cuando la temperatura se incrementa, la probabilidad de que ocurran colisiones aumenta. Por ello, cuando se utilizan temperaturas por encima de las indicadas, como en este caso 37°C , temperatura media fisiológica, y además mantenidas durante un periodo de tiempo prolongado, es importante estimar la degradación específica de los diferentes péptidos, siendo la longitud de su secuencia peptídica uno de los factores más influyentes. De la misma forma, el solvente utilizado para la disolución de los péptidos, tanto por pH como por concentración de sales, puede afectar a su carga neta y por lo tanto a su estabilidad final disminuyendo la respuesta del biosensor. El tampón para realizar los ensayos de actividad, 100mM TRIS-HCl pH8.5, se seleccionó en base a estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación por ser el óptimo para la actividad de la gzmA.

Por todo ello, se decidió hacer preliminarmente un ensayo para ver la posible degradación de los péptidos seleccionados en función de la temperatura y del tampón empleado a distintos tiempos de incubación. En la Figura 5.5. se puede observar la degradación de los péptidos a través de su espectro de emisión. Mientras P1 se mantiene estable a tiempos cortos,

P2 presenta una mayor intensidad de fluorescencia proporcional a su degradación, por lo que se podría decir que P1 es más estable que P2 en las condiciones establecidas.

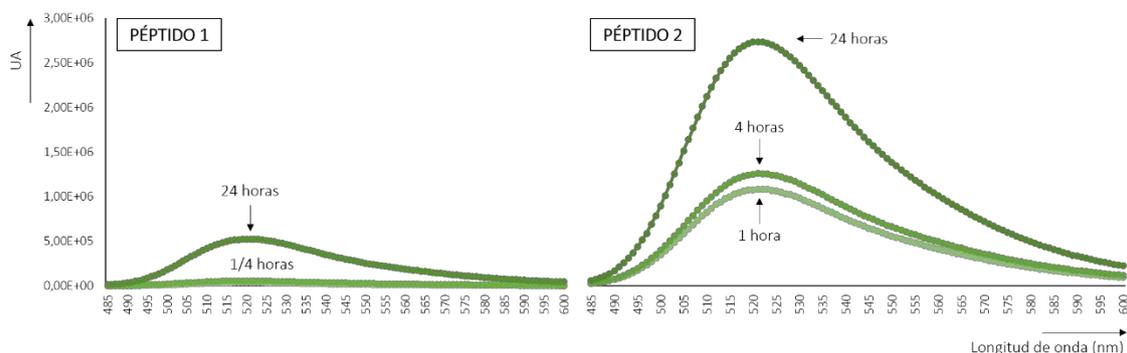


Figura 5.5.- Análisis de la estabilidad de las secuencias peptídicas funcionalizadas con FAM y DABCYL. P1 y P2 se utilizaron a una concentración final de $1\mu\text{M}$ en solución utilizando el tampón 100mM TRIS-HCl pH8.5 y un volumen final de $100\ \mu\text{l}$ en una placa de 96 pocillos. Después de la incubación de las muestras a 37°C en placa calefactora durante diferentes tiempos (1, 4 y 24 horas), se procedió a la lectura de la fluorescencia en cubeta de cuarzo tras la excitación a $475\ \text{nm}$ en un espectrofluorímetro. Las señales a “tiempo cero” o *background* de cada uno de los péptidos, fluorescencias obtenidas bajo las mismas condiciones exceptuando la incubación de los mismos, fueron restadas respectivamente a cada una de las curvas de emisión obtenidas.

5.1.3. Estudio de la sensibilidad mediante el uso de la *gzmA* recombinante

Tal y como se ha detallado anteriormente, la selección de P1 y P2 se realizó en base a estudios previos en los que se describía que ambos péptidos podían ser procesados por la *gzmA*, por lo que se procedió a realizar los primeros ensayos para calcular cual era la sensibilidad de cada uno de ellos haciendo uso de la *gzmA* recombinante, obtenida en nuestro grupo de investigación en colaboración con el Dr. Ramon Hurtado Guerrero, tal y como se describe en el Apartado 4.2.

Se comenzó testando un amplio rango de concentraciones de la *mGzmA* con una concentración fija de $1\ \mu\text{M}$ de sustrato. Tal y como se observa en la Figura 5.6., utilizando P1 fuimos capaces de detectar actividad hasta una concentración mínima de aproximadamente $78\ \text{ng}$ de enzima tras la primera hora de incubación, estableciendo este valor como su límite de detección. Una vez transcurrido este tiempo, las velocidades de reacción se redujeron, debido al agotamiento de la cantidad de sustrato disponible, y la sensibilidad disminuyó, obteniendo límites de detección de aproximadamente $0,625$ y $1,250\ \mu\text{g}$, tras 4 y 24 horas de incubación respectivamente, lo cual se debió principalmente a la pérdida de estabilidad de P1 con respecto al tiempo. Mientras, por el contrario, P2 presentó una actividad enzimática similar para las

RESULTADOS

diferentes concentraciones de la mGzmA tras una hora de incubación, siendo incapaces de determinar cuál era su límite de detección debido a la linealidad de su pendiente dentro del rango establecido. Tras 4 y 24 horas de incubación, P2 no mostró actividad enzimática frente a la mGzmA, siendo los valores obtenidos similares a los del propio *background* del péptido.

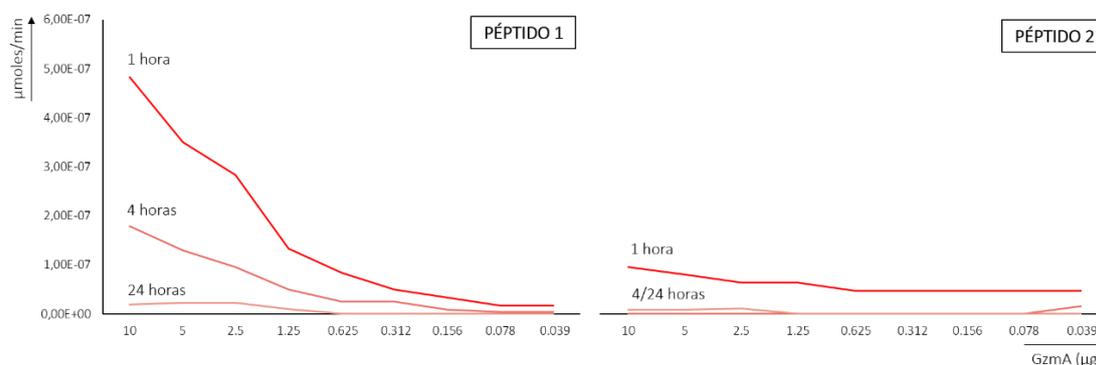


Figura 5.6.- Sensibilidad de los péptidos P1 y P2 frente a la mGzmA recombinante. Se incubaron diferentes concentraciones de la mGzmA recombinante (desde 10 hasta 0,039 ng) con una concentración final de 1µM de P1 y P2 utilizando el tampón 100mM TRIS-HCl pH8.5 y un volumen final de 100 µl en una placa de 96 pocillos. Después de la incubación de las muestras a 37°C en placa calefactora durante los diferentes tiempos (1, 4 y 24 horas), se midió la intensidad de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 475 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$) en un espectrofluorímetro y se transformó en valores de actividad enzimática. A cada uno de los valores obtenidos, se le restó la señal del péptido bajo las mismas condiciones en ausencia de la gzmA. Las curvas de emisión representadas muestran la media de 3 experimentos independientes.

Asimismo, se analizó la sensibilidad de P1 y P2 frente a la hGzmA bajo las mismas condiciones descritas con anterioridad. Los resultados obtenidos para ambos péptidos fueron bastante semejantes a los mostrados con la mGzmA, aunque tal y cómo se muestra en la Figura 5.7., hubo una tendencia algo superior en todos los puntos representados tras una hora de incubación con P1, alcanzando un límite de detección de aproximadamente 39 ng de enzima. De nuevo, en el caso de P2, apenas pudimos observar actividad enzimática independientemente del tiempo de incubación, de modo que podemos decir que P2 resultó ser menos sensible que P1.

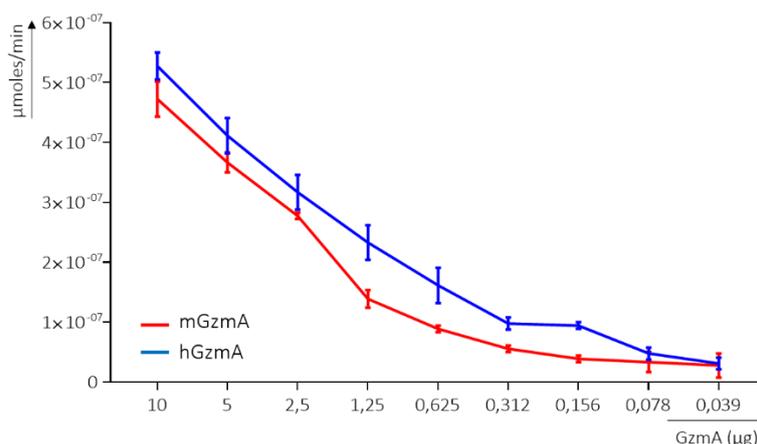


Figura 5.7.- Sensibilidad de P1 frente a la gzmA recombinante. Se incubaron diferentes concentraciones de la mGzmA y la hGzmA recombinantes (desde 10 hasta 0,039 ng), con una concentración final de 1μM de P1 utilizando el tampón 100mM TRIS-HCl pH8.5 y un volumen final de 100 μl en una placa de 96 pocillos. Después de 1 hora de incubación de las muestras a 37°C en placa calefactora, se midió la intensidad de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 475 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$) en un espectrofluorímetro y se transformó en valores de actividad enzimática. A cada uno de los valores obtenidos, se le restó la señal del péptido bajo las mismas condiciones en ausencia de la gzmA. El gráfico muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

A partir de estos resultados, y teniendo en cuenta el estudio de estabilidad de ambos péptidos (Apartado 5.1.2.), se decidió establecer como condición un único tiempo de incubación para estudios posteriores, siendo este de una hora por ser el punto en el que mejores resultados se habían conseguido hasta el momento.

5.1.4. Estudio de la especificidad de los péptidos frente a otras proteasas

Además de la sensibilidad, otra de las características destacables de cualquier biosensor es su especificidad o selectividad, es decir, su capacidad para evitar respuesta frente a otras sustancias, inclusive aquellas que presentan ciertas similitudes.

El análisis de la especificidad de P1 y P2 se llevó a cabo mediante la selección tanto de controles positivos como negativos para la gzmA. Como control positivo se utilizó tripsina, una enzima peptidasa cuya especificidad de corte es similar a la gzmA, y lisado de células de la línea de linfocitos T citotóxicos 1.3E6, que contienen gzmA activa. Mientras, como control negativo se empleó gzmB recombinante obtenida en nuestro grupo de investigación, una proteasa de serina que corta residuos de Asp (D). Como puede verse en la Figura 5.8., P1 fue cortado por la tripsina y por el lisado de células 1.3E6 (controles positivos) pero no por la gzmB (control negativo), mostrando así una elevada especificidad. Mientras, P2 mostró mayor degradación frente a tripsina

RESULTADOS

y menor frente a 1.3E6 en comparación con P1, aunque también fue cortado por la gzmB, de modo que podemos decir que P2 resultó ser menos específico que P1.

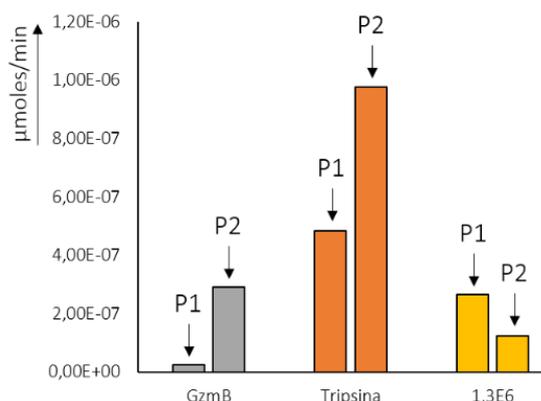


Figura 5.8.- Especificidad de los péptidos frente a diferentes proteasas. Se incubaron ambos péptidos a una concentración final de 1 µM con 10 µg de gzmB recombinante, 0,5 µg de tripsina y lisado de 10⁶ células 1.3E6 durante 1 hora a 37°C utilizando el tampón 100mM TRIS-HCl pH8.5 y un volumen final de 100 µl en una placa de 96 pocillos. Pasado este tiempo, se midió la intensidad de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 475 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$) en un espectrofluorímetro y se transformó en valores de actividad enzimática. A cada uno de los valores obtenidos, se le restó la señal del péptido bajo las mismas condiciones en ausencia de la gzmA. El gráfico muestra la media de 2 experimentos independientes.

A partir de los resultados obtenidos, finalmente se seleccionó P1 como biosensor a validar con muestras de origen murino y humano, por presentar una mayor sensibilidad y especificidad, así como una menor degradación bajo las condiciones experimentales establecidas.

5.1.5. Validación del sensor de la gzmA en muestras de origen murino y humano

Para llevar a cabo la validación de P1 después de haber sido seleccionado como el mejor candidato, en primer lugar, se analizó la actividad de la mGzmA en diferentes lisados de tejido, además de en CTLs extraídos y purificados tal y como se indica en el Apartado 4.8.2., todos ellos procedentes de ratones WT, gzmA^{-/-} y gzmK^{-/-} infectados previamente con el virus LCMV. Tal y como se muestra en la Figura 5.9., en todos los casos se observó un incremento significativo en la actividad de la gzmA detectada mediante el uso de P1 en las muestras de ratones WT con respecto a los ratones gzmA^{-/-}, valores que marcan el *background* de la técnica de detección en cada una de las muestras. Asimismo, las muestras de ratones gzmK^{-/-} mostraron un incremento todavía mayor que el obtenido con los ratones WT de la actividad enzimática, aunque únicamente resultó ser significativo el valor de los CTLs con respecto a estos últimos. Aunque no se muestra

en la Figura 5.9., también se analizaron lisados de páncreas y muestras de suero de los ratones WT, *gzmA*^{-/-} y *gzmK*^{-/-} infectados con el virus LCMV, pero no se observaron diferencias entre las distintas cepas.

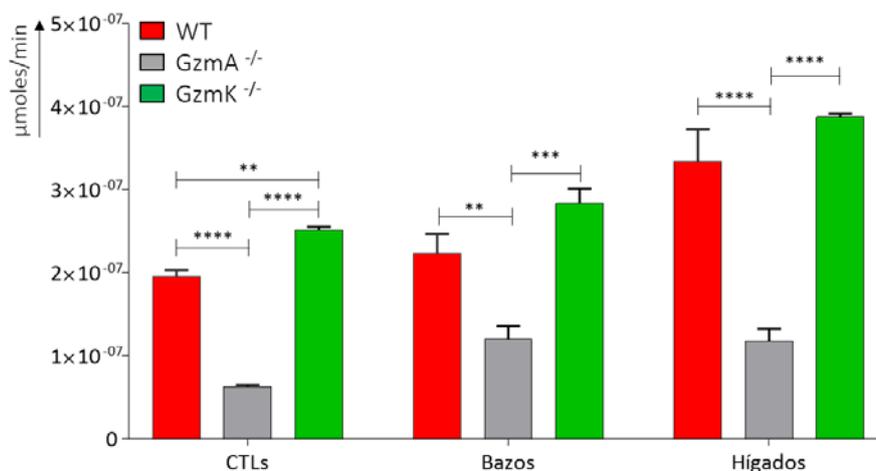


Figura 5.9.- Actividad de la *gzmA* en lisados de ratones WT, *gzmA*^{-/-} y *gzmK*^{-/-} infectados con LCMV. Ratones WT, *gzmA*^{-/-} y *gzmK*^{-/-} fueron inoculados vía i.p. con 10⁵ pfu del virus LCMV. Pasados 8 días tras la infección, los animales fueron sacrificados para la toma de muestras. Se realizó la lisis de los bazos e hígados, así como la extracción y purificación de los CTLs, tal y como se describe en el Apartado 4.8.2. A continuación, se procedió a incubar 5 μl de cada una de las muestras con P1 a una concentración final de 1 μM utilizando el tampón 100mM TRIS-HCl pH8.5, en un volumen de 100 μl en una placa de 96 pocillos durante 1 hora a 37°C. Pasado este tiempo, se midió la intensidad de fluorescencia (λ_{exc} = 475 nm, λ_{exc} = 520 nm) en un espectrofluorímetro y se transformó en valores de actividad enzimática. A cada uno de los valores obtenidos, se le restó la señal del péptido bajo las mismas condiciones en ausencia de muestra. Cada grupo experimental está compuesto por una N=4 y los gráficos representan la media ±SEM de 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un t test de Student, donde * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Asimismo, se utilizaron muestras de sueros de ratones infectados con *E. coli* para la detección de la actividad y la concentración de la mGzmA. Una de las principales desventajas en este método, es que la administración de altas dosis de bacterias puede provocar que una gran parte no colonice y se replique dentro del cuerpo, siendo lisadas por el sistema del complemento. Por lo tanto, esto podría conducir a un posible modelo de intoxicación con endotoxinas en lugar de un verdadero modelo séptico. Los resultados (Figura 5.10.) mostraron de nuevo diferencias entre las distintas cepas de ratón, mientras los ratones WT manifestaron un incremento significativo con respecto a los *gzmA*^{-/-}, los valores más altos de actividad enzimática y concentración de la *gzmA* fueron dados por los ratones *gzmK*^{-/-}.

RESULTADOS

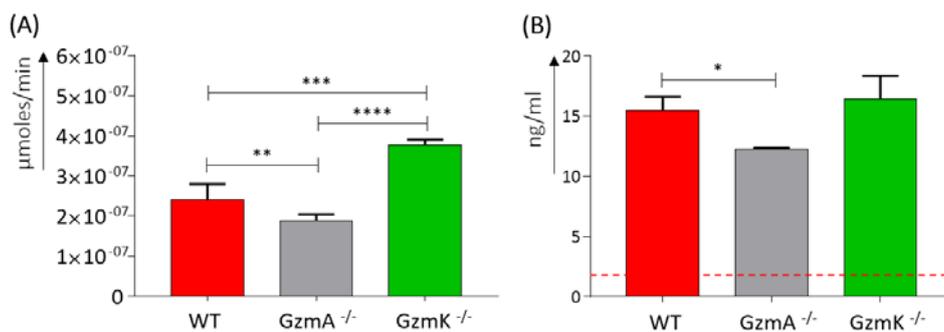


Figura 5.10.- Actividad y concentración de la *gzmA* en sueros de ratones WT, *gzmA*^{-/-} y *gzmK*^{-/-} infectados con *E. coli*. Ratones WT, *gzmA*^{-/-} y *gzmK*^{-/-} fueron infectados con *E. coli*, y pasadas 24 horas, fueron sacrificados para la toma de muestras. (A) Se procedió a incubar 5 μl de cada una de las muestras con P1 a una concentración final de 1 μM utilizando el tampón 100mM TRIS-HCl pH8.5 en un volumen final de 100 μl en una placa de 96 pocillos durante 1 hora a 37°C. Pasado este tiempo, se midió la intensidad de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 475 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$) en un espectrofluorímetro y se transformó en valores de actividad enzimática. A cada uno de los valores obtenidos, se le restó la señal del péptido bajo las mismas condiciones en ausencia de muestra. (B) Se cuantificaron los niveles de la mGzmA mediante ELISA, tal y como se describe en el Apartado 4.3.4.2. La línea discontinua representa el límite de detección de la técnica empleada. Cada grupo experimental está compuesto por una N=4 y los gráficos representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un t test de Student, donde * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

De forma paralela, se llevó a cabo la validación de P1 frente a la hGzmA utilizando muestras de suero procedentes de pacientes diagnosticados con peritonitis o sepsis abdominal, proporcionadas por el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Las muestras fueron recolectadas desde el momento del ingreso hasta 6 días después y comparadas con los niveles de actividad enzimática en sueros de pacientes sanos. Como muestra la Figura 5.11.A., los pacientes sépticos mostraron valores más elevados de actividad de la *gzmA* durante todas las tomas con respecto al control de pacientes sanos. Lo mismo ocurrió al analizar los valores de concentración de la hGzmA sobre estas mismas muestras (Figura 5.11.B.), en las que pudimos ver cómo los pacientes sanos mostraban niveles bajos de concentración dentro de un rango bastante homogéneo, mientras que, en los pacientes con sepsis, aunque había una mayor dispersión en los resultados dentro de cada una de las tomas, la media implicaba un incremento que en algunos casos resultó ser significativo.

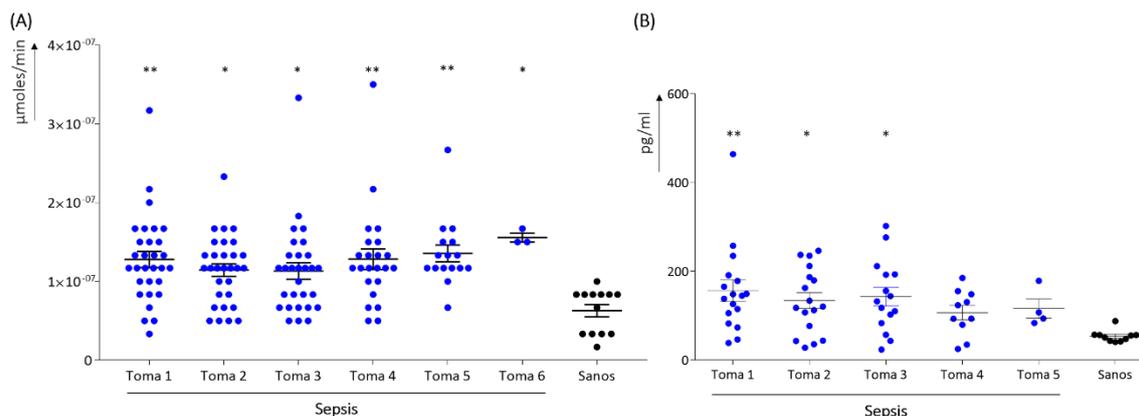


Figura 5.11.- Actividad y concentración de la *gzmA* en muestras de sueros de pacientes con sepsis. (A) Se incubaron 5 μl de las distintas muestras de pacientes con sepsis cedidas por el Hospital Clínico Lozano Blesa con P1 a una concentración final de 1 μM utilizando el tampón 100mM TRIS-HCl pH8.5 en un volumen final de 100 μl en una placa de 96 pocillos durante 1 hora a 37°C. A cada uno de los valores obtenidos, se le restó la señal del péptido bajo las mismas condiciones en ausencia de muestra. (B) Los sueros de los pacientes fueron analizados mediante ELISA, tal y como se describe en el Apartado 4.3.4.2. Ambos gráficos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de comparación múltiple de Dunnett con respecto al grupo control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Finalmente, quisimos comprobar si existía una correlación entre la actividad y la concentración de la hGzmA en las diferentes muestras por toma. Sin embargo, tal y como se muestra en la Figura 5.12., aunque el valor del coeficiente de correlación de Spearman de la última toma parecía indicar una relación lineal fuerte entre las variables, en ninguno de los casos encontramos una relación significativa debido a que la falta de un mayor número de datos hizo que esta consideración no pudiera ser validada.

RESULTADOS

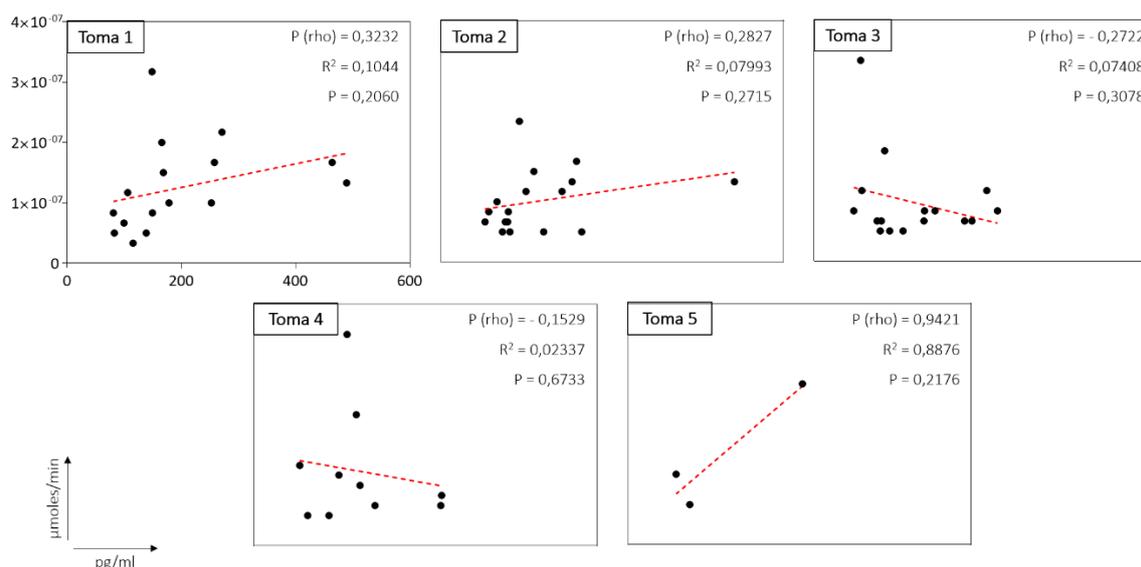


Figura 5.12.- Análisis de correlación entre actividad y concentración de la gzmA en muestras de pacientes con sepsis. El gráfico muestra la correlación entre la actividad y la concentración de la gzmA en muestras de suero de pacientes con sepsis. Se representa el valor del coeficiente de correlación de Spearman (ρ), el coeficiente R^2 y el valor p de correlación. Los datos representados fueron ajustados a un modelo de regresión lineal simple (línea discontinua).

5.1.6. Estudio de correlación entre la actividad de la gzmA y el pronóstico de pacientes con sepsis

Tras haber analizado la validez del sensor de la gzmA en muestras de pacientes con sepsis y en colaboración con el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y la Dra. Rebeca Sanz Pamplona, se estudió la posible correlación entre la actividad de la gzmA en suero y el pronóstico de los pacientes con sepsis. Desde el punto de vista clínico, la gravedad de esta patología puede medirse utilizando un score de evaluación secuencial de fallo orgánico relacionado con sepsis (SOFA; del inglés, "Sequential Organ Failure Assessment") (Tabla 5.1.). Un incremento superior a 2 tras la evaluación del paciente, se asocia con una mortalidad hospitalaria superior al 10%^{431,432}.

SCORE SOFA					
Sistema	0	1	2	3	4
<u>Respiración</u>					
PaO ₂ /FIO ₂ (mmHg)	≥400	<400	<300	<200 con soporte respiratorio	<100 con soporte respiratorio
<u>Coagulación</u>					
Recuento de plaquetas (x10 ³ /μl)	≥150	<150	<100	<50	<20
<u>Hígado</u>					
Bilirrubina (μmol/L)	<20	20-32	33-101	102-204	>204
<u>Cardiovascular</u>					
	MAP ≥70mmHg	MAP ≤70mmHg	Dop <0,1 o Dob ¹	Dop 5,1-15 Epi ≤0,1 Nor ≤0,1 ¹	Dop >15 Epi >0,1 Nor >0,1 ¹
<u>Sistema nervioso</u>					
Escala de coma de Glasgow ²	15	13-14	10-12	6-9	<6
<u>Renal</u>					
Creatinina (μmol/L)	110	110-170	171-299	300-440	>440
Volumen total de orina (ml/día)				<500	<200

Tabla 5.1.- Score SOFA. PaO₂: Presión parcial de oxígeno; FIO₂: Fracción de oxígeno inspirado; MAP: Presión arterial media; Dop: Dopamina; Dob: Dobutamina; Epi: Epinefrina; Nor: Norepinefrina. ¹Necesidad de administrar aminas presoras durante al menos 1 hora para mantener la presión sanguínea, los valores indican las dosis utilizadas en μg/Kg/min. ²La escala de coma de Glasgow es una escala diseñada para evaluar el nivel de consciencia en humanos.

Tal y como se observa en la Figura 5.13.A., al representar en una gráfica de correlación los datos del estado de los primeros 26 pacientes durante la primera toma de muestra y los valores de actividad enzimática de la hGzmA, se pudo observar como a mejor pronóstico menor actividad y a mayor actividad peor pronóstico, obteniendo una correlación positiva significativa entre ambos. Debido al escaso tamaño muestral del que se dispuso, la significación estadística de la relación entre actividad y pronóstico se realizó a través de un modelo de regresión lineal simple. Asimismo, se llevó a cabo el análisis de correlación entre el score y la concentración de la hGzmA en las muestras de pacientes con sepsis. De nuevo, se utilizó un modelo de regresión lineal simple, y tal y como se muestra en la Figura 5.13.B., se obtuvo una relación positiva moderada entre

RESULTADOS

ambos parámetros, aunque si nos fijamos en el valor p de correlación podemos comprobar que no resultó ser significativa.

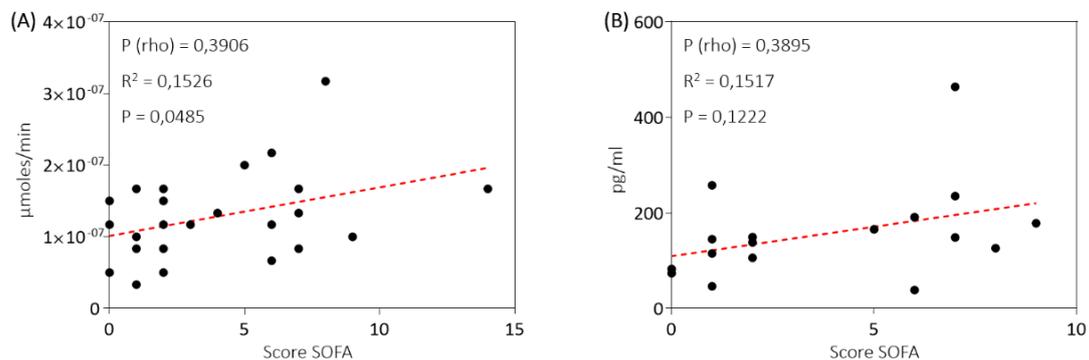


Figura 5.13.- Análisis de correlación entre la actividad de la gzmA y el pronóstico de pacientes con sepsis. El gráfico muestra la correlación entre la actividad de la gzmA en muestras de suero determinada mediante el uso del sensor seleccionado y el pronóstico establecido en base al score SOFA de pacientes con sepsis. Se representa el valor del coeficiente de correlación de Spearman (ρ), el coeficiente R^2 y el valor p de correlación. Los datos representados fueron ajustados a un modelo de regresión lineal simple (línea discontinua).

5.1.7. Discusión

Como ya se describía en el Apartado 1.1.3.3., las gzms son una familia de proteasas de serina clasificadas según su especificidad de corte y actividad proteolítica, siendo las más abundantes la gzmA y gzmB⁴¹⁵. Junto con la perf, las gzms constituyen el principal componente de la vía de exocitosis granular, mediante la cual las gzms son capaces de realizar sus funciones efectoras en el citosol de las células diana^{34,220}. Asimismo, diversidad de estudios han demostrado que las gzms pueden ser liberadas al medio extracelular donde ejercen otro tipo de funciones^{415,433}. Un ejemplo de ello es la gzmB, capaz de inducir la degradación de la matriz extracelular^{434,435} o de varias proteínas relacionadas con la cicatrización de heridas, el envejecimiento de la piel, la coagulación y la integridad de la barrera celular del endotelio^{74,436}. Sin embargo, las funciones extracelulares de la gzmA todavía no están claras, aunque existen algunas evidencias que sugieren su posible actuación como mediador proinflamatorio^{214,215,437}. Por ello, una de las propuestas para este trabajo de tesis, fue la evaluación de la actividad enzimática de la gzmA en algunas enfermedades de tipo inflamatorio e infeccioso^{438,439}, en las que trabajos previos habían descrito la presencia de niveles elevados de la gzmA, para intentar esclarecer si los efectos de la gzmA requieren o no de su actividad enzimática^{214,440}.

En la actualidad, cada vez son más los biosensores que se incorporan a la clínica como técnica de diagnóstico para la detección de determinadas patologías, gracias a las características que estos presentan: especificidad, alta sensibilidad, capacidad de respuesta que conduce a un corto tiempo de análisis, capacidad de inclusión en sistemas integrados, facilidad de automatización, versatilidad y bajo coste entre otras ⁴⁴¹. En consecuencia, para evaluar la actividad enzimática de la *gzmA*, se consideró el uso de secuencias peptídicas que habían sido previamente descritas por ser específicas frente a esta proteasa ^{254,430}, y tras la realización de los primeros ensayos, previos a la validación del biosensor, nuestros resultados permitieron la selección del péptido 1, cuya secuencia estaba formada por los aminoácidos VANRSAS, por haber mostrado una sensibilidad y especificidad adecuadas frente a la *gzmA* recombinante, tanto de origen murino como humano, así como estabilidad frente a la degradación a tiempos cortos.

La LCM, es una enfermedad infecciosa viral transmitida por roedores, que produce una meningitis aséptica, encefalitis o meningoencefalitis. El control de la infección viral producida por el LCMV depende crucialmente de los CTLs y es por ello por lo que, durante la infección, el nivel de estos se incrementa de forma considerable ^{442,443}, convirtiéndose así en un buen modelo de estudio para el análisis de las *gzms*.

Por otro lado, la sepsis supone uno de los problemas de salud a nivel mundial más importantes en la actualidad ^{444,445}. En ratón, el modelo de sepsis por *E.coli* es uno de los modelos más relevantes para el estudio de esta patología, ya que es uno de los patógenos más comúnmente asociados a la sepsis humana, a través del cual se ha conseguido proporcionar una visión de los mecanismos de respuesta contra patógeno ^{446,447}. La selección de esta patología se hizo en base a datos previos que apoyan la implicación de la inflamación y las *gzms* extracelulares y a su alta incidencia y mortalidad/morbilidad ^{448,449}, junto con la ausencia o baja eficacia y/o graves efectos secundarios de los tratamientos actuales ⁴⁵⁰⁻⁴⁵². Asimismo, en nuestro grupo de investigación, se había demostrado que la ausencia de la *gzmA* protegía a los ratones frente a la sepsis bacteriana *in vivo* sin comprometer el control del patógeno ²²². Aunque ya previamente se había observado una mayor resistencia de estos ratones a la endotoxemia inducida por LPS ^{86,214}.

Tras el análisis de las muestras utilizando ambos modelos de estudio, nuestros resultados mostraron niveles inferiores de actividad enzimática en los ratones deficientes en *gzmA*, sugiriendo que el uso del biosensor seleccionado podría ser útil para la detección de la actividad enzimática de la *gzmA* en muestras de tejido y en fluidos biológicos de origen murino.

RESULTADOS

Al igual que la gzmA, la gzmK se caracteriza por ser una proteasa de serina con actividad triptasa que corta los sustratos tras los residuos de Lys y Arg, sin embargo, se ha descrito que la especificidad de sustrato difiere de la gzmA ⁴⁵³, lo cual explicaría una posible diferencia en la contribución en algunas patologías. Nuestro grupo de investigación demostró que la gzmK también era capaz de inducir la activación de una respuesta inflamatoria tanto en MØ como en otro tipo de células ⁴¹⁵. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los ratones deficientes en esta proteasa controlaban la infección viral por LCMV de forma tan eficiente como lo hacían los ratones WT ⁴⁵⁴. Nuestros resultados en ambos modelos mostraron una elevación de los niveles de actividad enzimática de la gzmA en los ratones deficientes en gzmK, lo cual podría no apoyar la hipótesis acerca de que la gzmK no es relevante para el control de algunas infecciones. No obstante, la concentración de la gzmA en el modelo de infección por LCMV no se vio aumentada en los ratones deficientes en gzmK, sugiriendo que una mayor expresión de la gzmA no siempre debe de asociarse a una mayor actividad de la misma y viceversa.

Además, nuestros resultados apoyaron datos previos que indicaban el aumento de la concentración de la gzmA en pacientes con sepsis bacteriana y con endotoxemia experimental en comparación con pacientes sanos ²²¹. Junto con el aumento de la concentración, nuestros resultados mostraron que tenía lugar un incremento de la actividad enzimática de la misma, sugiriendo la implicación de la gzmA extracelular en la patogénesis de esta enfermedad, así como la validación del biosensor para la determinación de la actividad enzimática de esta proteasa en muestras de origen humano. Finalmente, los resultados de correlación entre la actividad enzimática de la gzmA y el estado de los pacientes con sepsis demostraron que la gzmA extracelular podría ejercer efectos proinflamatorios perjudiciales durante la sepsis asociada a patógenos bacterianos.

5.2. Ensayos de inhibición de la expresión *in vitro* de la granzima A

5.2.1. Estudio de la eficiencia de transfección *in vitro* de la mGzmA/GFP sobre la línea celular HeLa

La transfección o introducción de material genético exógeno en células eucariotas en cultivo ha demostrado ser una herramienta eficaz para una gran diversidad de estudios en el campo de la biología molecular y celular. Mediante diferentes técnicas de transfección es posible alterar el genoma de una célula, ya sea de forma transitoria o estable, para que produzca una determinada proteína recombinante sobre la cual poder realizar estudios *in vitro*.

Para el estudio de la mGzmA, se generó un transfectante celular que expresara la proteína de fusión formada por la mGzmA y la GFP, con el fin de obtener un sistema rápido y sencillo, sobre el cual evaluar posteriormente la eficacia de la inhibición de la mGzmA. Asimismo, se seleccionó la línea celular HeLa, ya que se trata de una línea muy estable con una alta tasa de replicación, y el vector retroviral pBABE, que incluye regiones LTR (del inglés, “Long Terminal Repeat”), las cuales facilitan la integración de la secuencia de interés dentro del genoma de las células hospedadoras. Con todo ello, se procedió a establecer cuáles eran las condiciones de transfección más adecuadas para obtener la máxima eficiencia posible, entre las que se incluyen confluencia, medio de cultivo, método de transfección o periodo óptimo de expresión entre otras.

Una vez realizada la optimización, se decidió llevar a cabo la transfección de las células HeLa mediante el método de lipofección con Lipofectamina, basado en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y ADN, tal y como se describe en el Apartado 4.5.1., y analizar la expresión del gen pasadas 48 horas tras la transfección. Por un lado, se extrajo el ADN plasmídico (Apartado 4.1.3.) para verificar la amplificación mediante PCR de la secuencia correspondiente a la mGzmA/GFP (Figura 5.14.A.) y, por otro lado, se extrajeron las proteínas totales (Apartado 4.3.2.1.) para analizar la expresión de la GFP mediante Western-Blot (Figura 5.14.B.), comprobándose en ambos casos que la transfección se había realizado correctamente. Finalmente, se determinó la eficiencia de transfección mediante citometría de flujo, tal y cómo se muestra en la Figura 5.14.C., dónde se observó que, a pesar de haber optimizado las condiciones de trabajo, únicamente un 1,43% de las células HeLa-mGzmA/GFP expresaban

RESULTADOS

fluorescencia en el canal de emisión de la proteína GFP, lo que se correlacionó con los niveles de expresión cuantificados a través de la intensidad media de fluorescencia (MFI; del inglés, “Median Fluorescence Intensity”). Como control positivo, se transfectaron células HeLa con el vector pBABE que contenía la secuencia para la expresión de la GFP en ausencia de la *gzmA*, ya que estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación habían mostrado una alta eficiencia en la incorporación de dicho constructo por parte de las células.

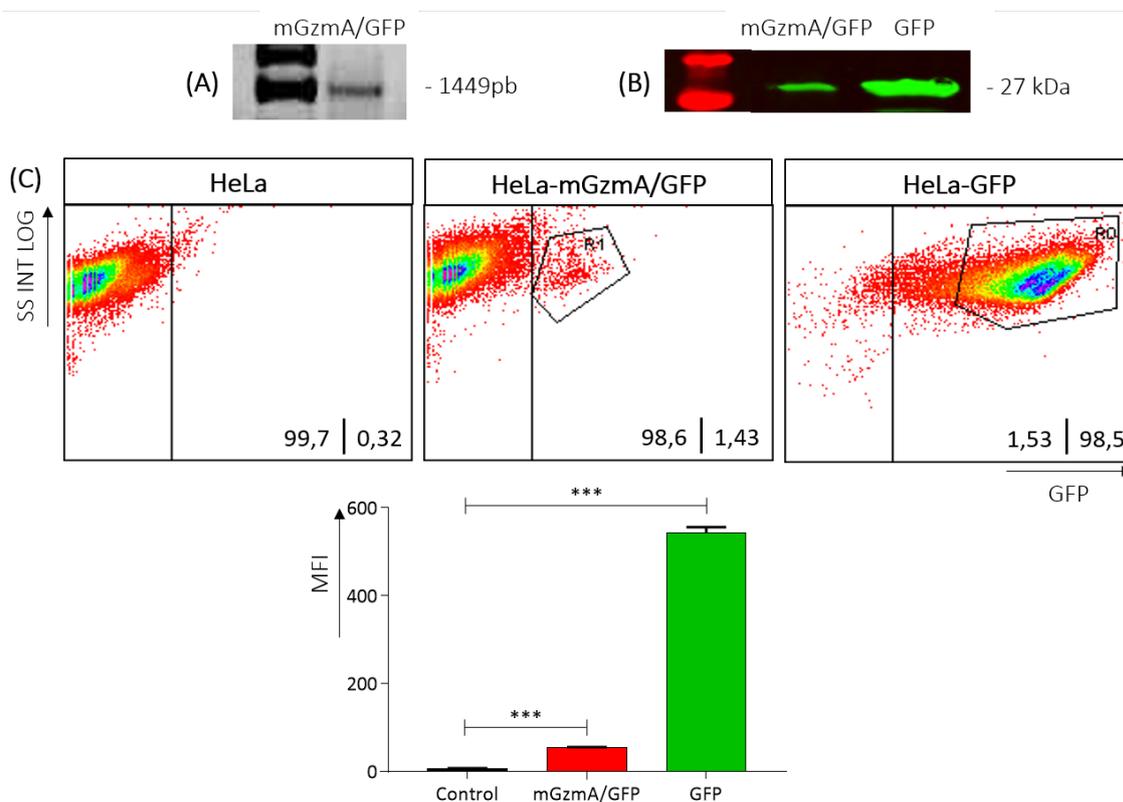


Figura 5.14.- Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes mGzmA/GFP y GFP. Determinación de la eficiencia de transfección en la línea celular HeLa. Las células HeLa fueron transfectadas utilizando el reactivo Lipofectamina con los vectores pBABE-mGzmA/GFP y pBABE-GFP con una relación 3:1, tal y como se describe en el Apartado 4.5.1. Pasadas 48 horas tras la transfección, (A) y (B) las células fueron lisadas para la extracción del ADN y la extracción de las proteínas totales, y se procedió a su análisis mediante PCR y Western-Blot respectivamente; (C) las células fueron analizadas mediante citometría de flujo. Como control se utilizaron células HeLa y células HeLa-GFP. Dot plots representativos del porcentaje de células GFP⁺ para cada una de las diferentes líneas analizadas. Los números en la esquina inferior muestran el porcentaje de células correspondientes a cada cuadrante. El gráfico representa la media \pm SEM de 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un t test de Student, donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Para intentar solventar la baja eficiencia de transfección de la mGzmA/GFP, se decidió llevar a cabo la transfección estable del gen en las células HeLa, en lugar de la transfección transitoria, es decir, intentar que el ADN se incorporara dentro del genoma de las células y se transmitiera a su progenie. Para ello, empleando las mismas condiciones establecidas

anteriormente, las células HeLa fueron transfectadas, y una vez transcurridas 48 horas, se intentó llevar a cabo la selección por resistencia al antibiótico puromicina, ya que el vector pBABE confiere resistencia a las células que lo hayan incorporado. Sin embargo, al cabo de unos días y empleando diferentes concentraciones de antibiótico, dosis más bajas de lo que habitualmente se establece para la selección de las líneas mediante este procedimiento, se produjo la muerte de la práctica totalidad de las células, lo que sugiere que debido al bajo porcentaje de células que se transfectan podía no tratarse de un buen método de selección. Por ello, como método alternativo para obtener la línea celular estable HeLa-mGzmA/GFP, se llevó a cabo la selección de las células GFP⁺ mediante la separación celular por citometría de flujo, y para asegurar un nivel de sobreexpresión homogéneo de la mGzmA/GFP, posteriormente se realizó una dilución límite, tal y como se describe en el Apartado 4.5.2., con aquellas células que habían sido preseleccionadas. Como control, este mismo procedimiento también fue utilizado para conseguir la línea estable HeLa-GFP.

Para verificar que se habían generado ambas líneas estables, en primer lugar, tal y como se muestra en la Figura 5.15.A., se observó mediante microscopia de fluorescencia la expresión de la GFP, aunque si nos fijamos en los resultados obtenidos mediante citometría de flujo (Figura 5.15.B.), podemos ver como la intensidad de fluorescencia varía, siendo mayor en el caso de las células HeLa-GFP, lo cual sugiere una mayor expresión de la proteína por parte de estas células. Asimismo, cómo se observa en la Figura 5.15.C., se realizó el marcaje intracelular de la gzmA en las células HeLa-mGzmA/GFP (Apartado 4.3.3.2.), pudiendo observar cómo tenía lugar un desplazamiento del pico con respecto a las células HeLa control. Finalmente, la secuenciación del ADN de las células HeLa-mGzmA/GFP y HeLa-GFP confirmó los resultados previamente obtenidos.

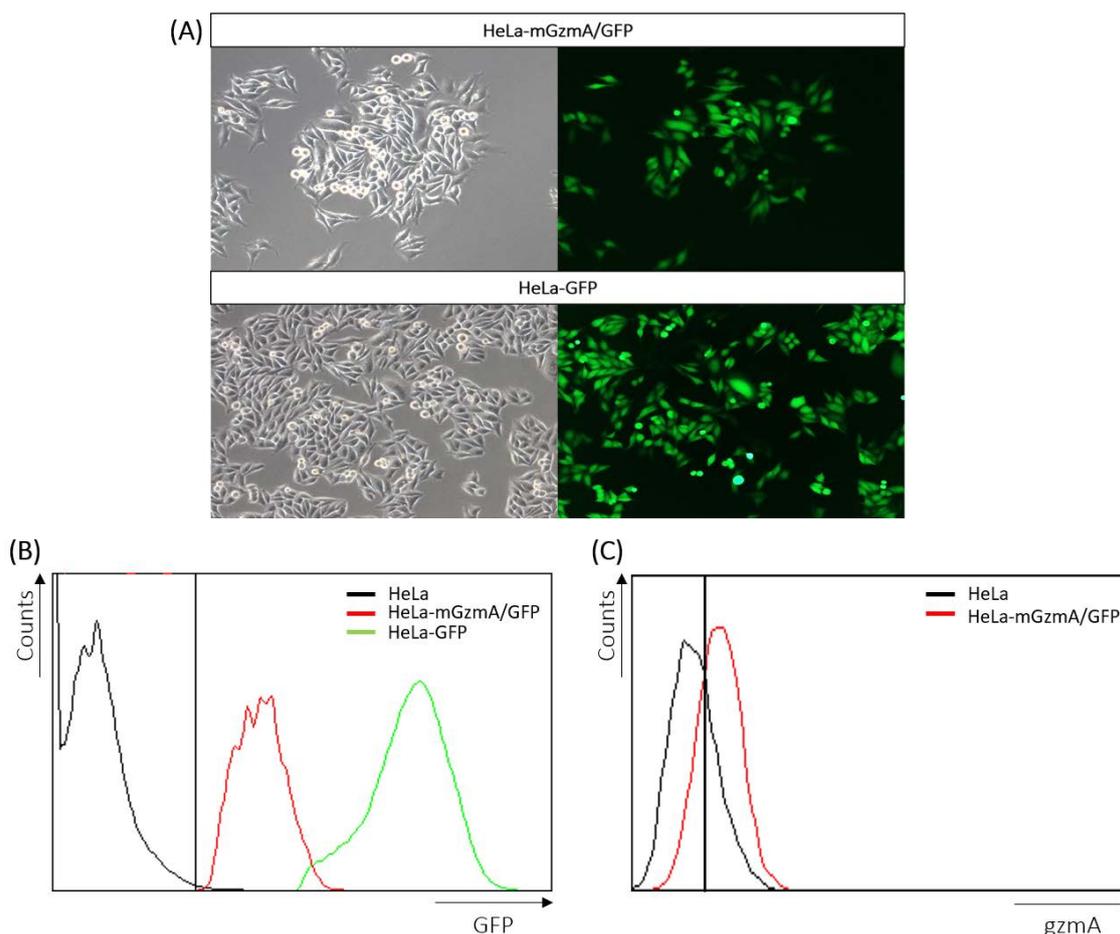


Figura 5.15.- Análisis de las líneas celulares HeLa-mGzmA/GFP y HeLa-GFP. Las células HeLa fueron transfectadas utilizando el reactivo Lipofectamina con los vectores pBABE-mGzmA/GFP y pBABE-GFP con una relación 3:1, tal y cómo se describe en el Apartado 4.5.1. Pasadas 48 horas tras la transfección, las células GFP⁺ fueron preseleccionadas mediante separación celular por citometría de flujo y, a continuación, se llevó a cabo una dilución límite hasta obtener un único clon concreto de cada una de las líneas de interés. (A) Se tomaron imágenes de las células HeLa-mGzmA/GFP y HeLa-GFP mediante microscopía de fluorescencia (Apartado 4.6.1.). (B) Se analizó la expresión de la GFP en las células HeLa-mGzmA/GFP y HeLa-GFP mediante citometría de flujo. Como control se utilizaron células HeLa sin transfectar. Histograma representativo de la intensidad de expresión de la GFP en las diferentes líneas analizadas. (C) Se realizó el marcaje intracelular de la gzmA en las células HeLa-mGzmA/GFP, tal y como se describe en el Apartado 4.3.3.2. Como control se utilizaron células HeLa sin transfectar. Histograma representativo de la intensidad de expresión de la gzmA en las diferentes líneas analizadas.

5.2.2. Estudio del silenciamiento génico *in vitro* de la mGzmA/GFP mediado por siARNs sobre la línea celular HeLa transfectada

El mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional mediado por el ARN de interferencia (iARN), se trata de un mecanismo de regulación presente de forma natural en el organismo, y evolutivamente conservado. Esta implicado en el desarrollo y en la defensa contra los virus, y se regula por pequeñas moléculas de ARN bicatenario de 21 a 27 nucleótidos

denominadas siARNs. En el interior de la célula, durante una serie de procesos, el siARN se desdobra y una de las hebras se une a la cadena del mRNA de manera específica por complementariedad de bases, induciendo que el complejo resultante sea reconocido para ser degradado. Sin embargo, los siARNs también pueden ser sintetizados e introducidos artificialmente en el organismo con el fin de silenciar un gen específico, constituyendo una herramienta para el estudio de las funciones de los genes, la validación de determinadas dianas terapéuticas o como terapia para determinadas enfermedades de origen genético^{455,456}.

Por ello, nos planteamos llevar a cabo el silenciamiento génico *in vitro* de la mGzmA sobre la línea celular estable HeLa-mGzmA/GFP utilizando siARNs específicos y, posteriormente, analizar cualquier variación en la expresión del mRNA mediante RT-qPCR. Previo a la evaluación del silenciamiento, se optimizaron los volúmenes de muestra, la concentración de los oligonucleótidos y la Tª óptima de hibridación. Como control para normalizar los valores obtenidos en cuanto al gen de interés, se decidieron emplear los genes constitutivos o *housekeeping* HPRT y GAPDH y se determinó cuál era su especificidad mediante las curvas de disociación de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de cada uno de ellos, así como también se analizaron las curvas de disociación para los cebadores de la mGzmA/GFP. A través de los resultados obtenidos (Figura 5.16.), pudimos observar como mientras las curvas correspondientes al gen mGzmA/GFP y HPRT daban lugar a un único pico, en el caso de la GAPDH aparecía un segundo pico relacionado con la formación de dímeros indeseados.

Por otro lado, ya que es condición para poder analizar los datos mediante el método comparativo ($2^{-\Delta Ct}$) que la eficiencia del gen de interés sea aproximadamente igual a la eficiencia del gen de referencia⁴⁵⁷, también se realizó el cálculo de las eficiencias de reacción en base a la pendiente generada entre los valores de CT (del inglés, "Cycle Threshold") y las diferentes diluciones del ADN. El CT es el ciclo en que se alcanza el umbral de fluorescencia, y es inversamente proporcional a la expresión de los diferentes genes analizados, es decir, a mayor valor CT menor expresión del gen. Mientras que los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la mGzmA/GFP y el HPRT dieron valores dentro del rango considerado como aceptable (80-110%), la eficiencia resultante para el gen GAPDH fue aproximadamente del 78%, por lo que finalmente, se decidió únicamente basar los cambios relativos de la gzmA con referencia al gen endógeno HPRT.

RESULTADOS

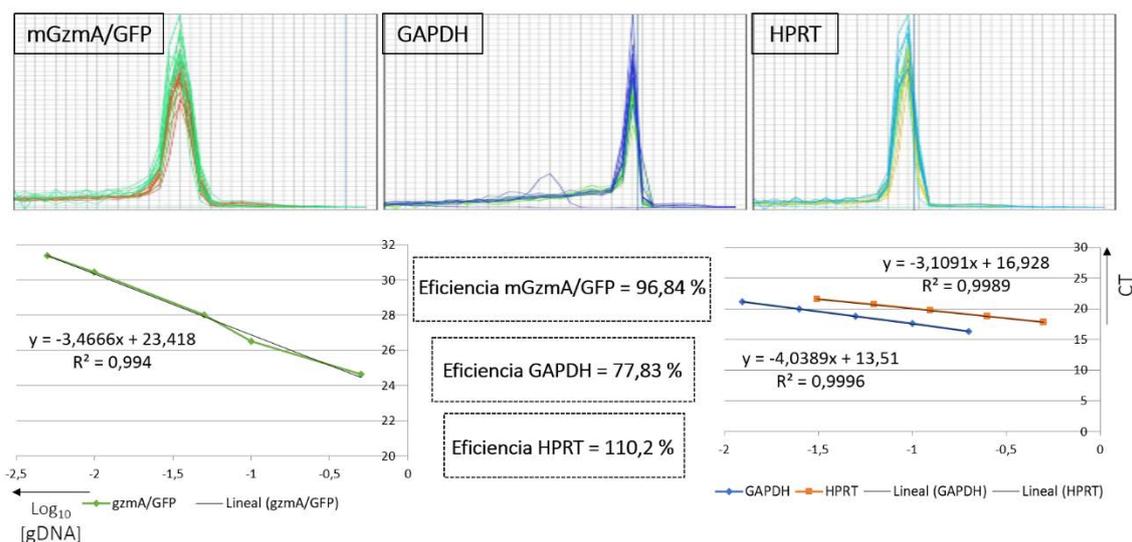


Figura 5.16.- Análisis de las curvas de disociación y eficiencia de los oligonucleótidos empleados para el estudio de la expresión de la mGzmA/GFP. En la parte superior se muestran las curvas de disociación de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de mGzmA/GFP, GAPDH y HPRT. En la parte inferior se muestran las curvas estándar de la RT-qPCR representadas gráficamente mediante una línea de regresión lineal semilogarítmica entre los valores de CT y la concentración de distintas diluciones del ADN. La eficiencia se calcula con la fórmula $E=10^{(-1/\text{pendiente})}-1$. Así, una pendiente de -3,32 indica una reacción de PCR con una eficiencia del 100%. Se consideró como aceptable el rango $80\% \leq E \leq 110\%$.

Una vez establecidos los parámetros de reacción, se llevó a cabo la transfección de las células HeLa-mGzmA/GFP mediante el método de lipofección empleado anteriormente, con cuatro siARNs diferentes sintetizados por la casa comercial Dharmacon, todos ellos descritos como específicos frente a la mGzmA, con el objetivo de poder seleccionar cual era capaz de silenciar la expresión del gen de forma más eficiente para experimentos posteriores. Tal y como se muestra en la Figura 5.17., pasadas 48 horas tras la transfección con los diferentes siARNs anti-GzmA, mediante el uso del siARN “número 3” se obtuvo casi un 70% de inhibición de la expresión, por lo que fue seleccionado como el más eficiente. Como control, también se empleó un siARN anti-GFP, el cual también fue capaz de reducir la expresión del gen mGzmA/GFP hasta aproximadamente en un 50% en las células HeLa transfectadas.

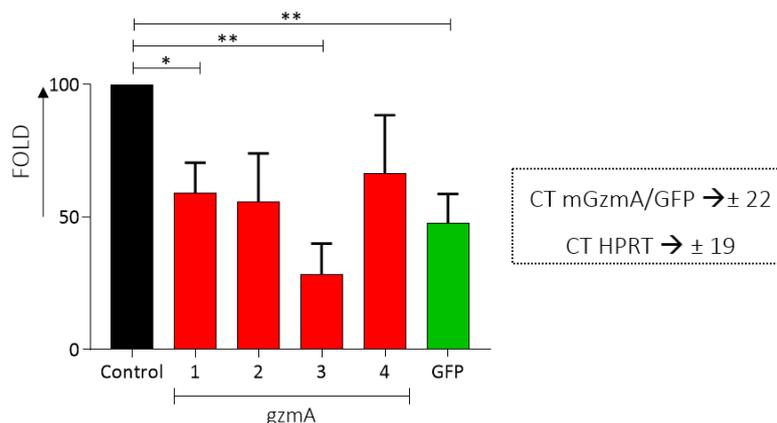


Figura 5.17.- Análisis de la expresión de la mGzmA/GFP mediante RT-qPCR tras el silenciamiento génico con diferentes siARNs sobre la línea celular HeLa. Las células HeLa-mGzmA/GFP fueron transfectadas utilizando el reactivo Lipofectamina, tal y como se describe en el Apartado 4.5.1., con una concentración de 125 pmol de cada uno de los diferentes siARNs (anti-GzmA y anti-GFP). Pasadas 48 horas tras la transfección, las células fueron lisadas para la extracción del ARN a partir del cual se generó cADN, tal y como se describe en el Apartado 4.1.10., para finalmente, proceder a su cuantificación mediante RT-qPCR. Los valores de expresión de la mGzmA/GFP fueron normalizados en base a la cantidad de mRNA detectada para el gen HPRT. Como control se transfectaron células HeLa-mGzmA/GFP en ausencia de siARN. El gráfico representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un t test de Student, donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Además del método de lipofección para la transferencia del material genético hacia el interior de la célula, existen múltiples alternativas como el uso de nanotransportadores poliméricos, los cuales han demostrado ser altamente eficientes para el silenciamiento génico, ofreciendo ventajas únicas como la protección del siARN contra la degradación o el aumento de las interacciones con el entorno biológico ³⁰⁹. Por ello, nos planteamos llevar a cabo la transfección de las células HeLa-mGzmA/GFP mediante el uso de NCs de quitosano que contenían el siARN anti-GzmA seleccionado previamente (siARN-NCs). Dichas NCs fueron sintetizadas por el grupo del Dr. Jesús Martínez de la Fuente. En primer lugar, se realizó un análisis de la viabilidad de las células HeLa-mGzmA/GFP tras su incubación con diferentes concentraciones de los complejos siARN-NCs, tal y como se muestra en la Figura 5.18. Para llevar a cabo este estudio, se fijó un único tiempo de incubación de 4 horas, en base al tiempo que tardan las NCs en internalizar en las células. Finalmente, se seleccionó la concentración de 125 $\mu\text{g/ml}$ como la más adecuada para experimentos posteriores, por ser una concentración relativamente alta en la que la supervivencia celular continúa siendo superior al 80%.

RESULTADOS

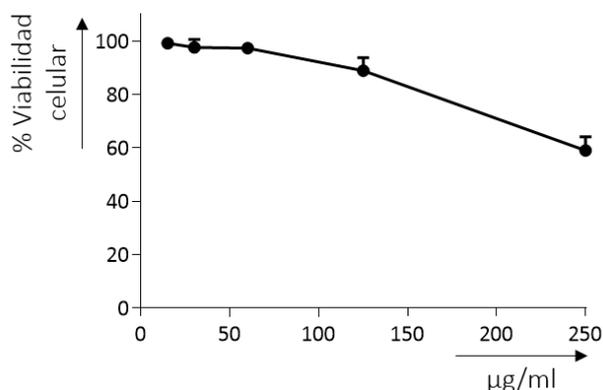


Figura 5.18.- Análisis de la toxicidad de los complejos siARN-NCs sobre la línea celular HeLa-mGzmA/GFP. Las células HeLa-mGzmA/GFP sembradas a una densidad de 10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, fueron incubadas durante 4 horas a 37°C con diferentes concentraciones de siARN-NCs (desde 250 hasta 15 $\mu\text{g/ml}$). Transcurrido este tiempo, se analizó la viabilidad celular mediante MTT, tal y como se describe en el Apartado 4.4.4. El gráfico representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

A continuación, se procedió a transfectar las células HeLa-mGzmA/GFP con los complejos siARN-NCs bajo las condiciones experimentales establecidas. Sin embargo, tras la realización de numerosos ensayos y su análisis mediante diferentes técnicas (PCR, RT-qPCR, Western-Blot, ELISA y citometría de flujo) para visualizar cualquier posible variación, tanto en la expresión del mRNA como en la expresión proteica de la mGzmA o de la GFP, no se logró alcanzar el silenciamiento génico *in vitro* de la mGzmA/GFP mediante el uso de estos nanocomplejos. Esto podría ser debido a que el siARN no se “libera” de las NCs una vez en el interior de la célula al quedar adherido al quitosano, por lo que se requiere continuar investigando sobre la mejora de las condiciones que permitan que el siARN pueda inhibir la expresión del gen.

5.2.3. Estudio de la internalización *in vitro* de las NCs de quitosano en PBMCs y esplenocitos mediante citometría de flujo

Las gzms, tal y como se describía en el Apartado 1.1.3.3., se localizan principalmente en el interior de los gránulos citotóxicos de linfocitos Tc y células NK⁴¹⁵, por lo que nos planteamos analizar el grado de internalización de las NCs de quitosano diseñadas para llevar a cabo el silenciamiento de la gzmA, en estos dos tipos de poblaciones celulares. La internalización de las NCs, así como su retención en las células deseadas, resulta de gran importancia en cuanto a desempeñar su función como sistemas de transporte, y aunque los procesos biológicos *in vitro* e *in vivo* pueden presentar diferencias, los ensayos *in vitro* pueden proporcionar evidencias preliminares que demuestren las ventajas de estas formulaciones⁴⁵⁸. Por ello, en paralelo al

estudio del silenciamiento génico de la mGzmA/GFP, se utilizaron NCs vacías marcadas fluorescentemente con la sonda BODIPY FL ($\lambda_{ex}=503$ nm, $\lambda_{em}=512$ nm) y en base a los resultados obtenidos previamente acerca de la toxicidad de las NCs sobre la línea celular HeLa, establecimos el valor tanto de la concentración (125 μ g/ml) como del tiempo de incubación (4 horas).

Por un lado, se extrajeron los esplenocitos del bazo de un ratón C57BL/6 WT, el cual fue disgregado tal y como se describe en el Apartado 4.8.1., para poder realizar los marcajes de las dos poblaciones de interés con CD3 y NK1.1., así como con 7-AAD para el análisis de la toxicidad mediante citometría de flujo. Tal y como se muestra en la Figura 5.19.A., las NCs utilizadas no fueron tóxicas sobre los esplenocitos, como era de esperar, bajo las condiciones preestablecidas. En cuanto a su internalización, podemos observar cómo en presencia de las NCs, la población doble positiva se incrementó hasta un 26,5% en el caso de los linfocitos T y hasta un 3,33% en el caso de las células NK, lo cual sugiere que, teniendo en cuenta el porcentaje total para la población CD3⁺ y NK1.1.⁺, la internalización de las NCs se producía aproximadamente en el 70% de ambos tipos celulares.

Por otro lado, se extrajeron las células de sangre total, tal y como se describe en el Apartado 4.4.5., y se procedió a su marcaje con CD3 y CD56, así como con 7-AAD para el análisis de la toxicidad mediante citometría de flujo. En primer lugar, se descartó que las NCs pudieran resultar tóxicas sobre las PBMCs y, a continuación, tal y como se muestra en la Figura 5.19.B., mediante el porcentaje de frecuencia normalizada y el desplazamiento de pico hacia una mayor intensidad de BODIPY se observó que en torno a un 51% de los linfocitos T y un 16,3% de las células NK habían internalizado NCs. Gracias al sistema combinado de citometría de flujo y de captura microscópica de imágenes a alta velocidad que presenta el sistema morfocitométrico ImageStreamX AMNIS (Merck) empleado para llevar a cabo este ensayo de internalización, también se obtuvieron imágenes de las diferentes poblaciones con sus correspondientes marcajes extracelulares, en las que se podía observar la presencia de las NCs en el interior de cada una de ellas.

Como control, se emplearon esplenocitos y PBMCs bajo las mismas condiciones experimentales en ausencia de NCs, para establecer los parámetros adecuados para la compensación del efecto de solapamiento de los espectros de emisión de los diferentes fluorocromos utilizados.

RESULTADOS

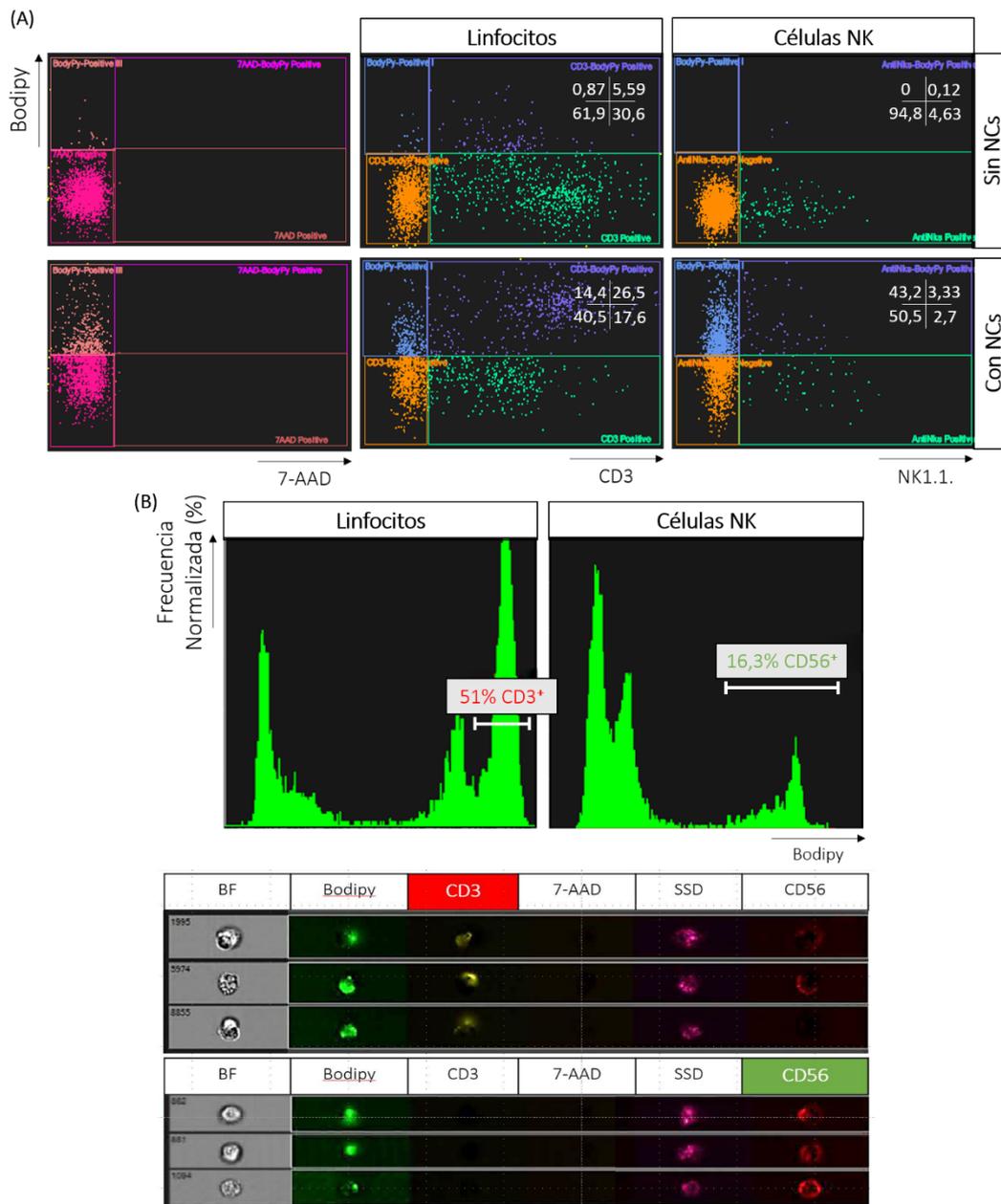


Figura 5.19.- Análisis de la internalización de las NCs de quitosano mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia en esplenocitos y PBMcs. (A) Se extrajeron las células del bazo de un ratón C57BL/6 WT de 6-8 semanas y se procedió a su disgregación con ayuda de un émbolo, tal y como se describe en el Apartado 4.8.1. Las células finalmente obtenidas se sembraron a una densidad de 10^6 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 4 horas a 37°C con una concentración de $125\ \mu\text{g/ml}$ de NCs marcadas fluorescentemente con BODIPY FL. Pasado este tiempo, se procedió al marcaje de las células con 7-AAD, CD3 y NK.1.1., para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Dot plots representativos del porcentaje de células BODIPY⁺ para cada una de las poblaciones analizadas. Los números en la esquina superior muestran el porcentaje de células correspondientes a cada cuadrante. (B) Se extrajeron las células de sangre total procedentes de *buffy coats*, tal y como se describe en el Apartado 4.4.5., se sembraron a una densidad de 10^6 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 4 horas a 37°C con una concentración de $125\ \mu\text{g/ml}$ de NCs marcadas fluorescentemente con BODIPY FL. Pasado este tiempo, se procedió al marcaje de las células con 7-AAD, CD3 y CD56, para su posterior análisis mediante citometría de flujo y microscopia. Histogramas de frecuencia normalizada e imágenes representativas para la intensidad del BODIPY sobre cada una de las poblaciones analizadas.

5.2.4. Estudio de la biodistribución de las NCs y MCs de quitosano *in vivo*

Las NCs de quitosano empleadas para el estudio del silenciamiento génico de la *gzmA* fueron testadas en el grupo del Dr. Jesús Martínez de la Fuente bajo diferentes “condiciones fisiológicas” simuladas *in vitro* para analizar cuál era su comportamiento. Sin embargo, y cómo ya se mencionaba anteriormente, las condiciones *in vivo* no siempre se correlacionan directamente con los resultados obtenidos *in vitro*, por lo que se decidió analizar en paralelo la biodistribución *in vivo* de las NCs de quitosano.

Para ello, se usaron NCs vacías marcadas fluorescentemente con la sonda DY-780 (NCs_DY780) y se administraron vía oral mediante una sonda gástrica a una concentración de 500 µg/ratón. El fluoróforo DY_780 fue seleccionado ya que su $\lambda_{em}=780$ nm tiene lugar en la región espectral del infrarrojo cercano (NIR), dónde las señales de fondo correspondientes a la autofluorescencia de los tejidos se reducen drásticamente, mejorando la sensibilidad de la detección⁴⁵⁹. Por otro lado, la concentración de NCs_DY780 administradas fue seleccionada en base a ensayos previos en los que se observó cómo sin ser una dosis tóxica para los ratones, se podía detectar en el equipo de imagen con la suficiente intensidad como para ser localizadas en el tracto digestivo. Asimismo, se decidió realizar el seguimiento de las NCs_DY780 mediante la toma de imágenes a diferentes tiempos, basándonos en el tránsito gastrointestinal de los ratones, el cual tarda aproximadamente entre 6 y 8 horas en completarse⁴⁶⁰, por lo que se realizó el estudio desde un tiempo corto de 4 horas, en el que hubiera posibilidad de localizar las NCs en el interior de los animales, hasta tiempos largos de 24 y 48 horas, en los que poder comprobar si habían sido eliminadas del organismo.

Establecidas las condiciones experimentales, los animales fueron examinados *in vivo* tras administrarles una dosis letal de anestésico, tal y cómo se describe en el Apartado 4.8.4., y a continuación, los tejidos fueron extraídos para ser analizados *ex vivo*. Como control, se utilizaron ratones a los que se les administró agua de bebida siguiendo el mismo procedimiento para que, tras la manipulación, el estrés causado fuera similar en los distintos grupos experimentales. Estudios previos han descrito que, en función del nivel de estrés, los movimientos peristálticos del intestino se alteran y, por lo tanto, el tránsito gastrointestinal varía⁴⁶¹.

Como se muestra en la Figura 5.20., pasadas 4 horas tras la administración vía oral de las NCs_DY780, en todos los ratones tratados se observó fluorescencia en el tracto gastrointestinal

RESULTADOS

a diferencia del grupo control. Una vez extraído el paquete intestinal de cada uno de los ratones, pudimos observar cómo las NCs_DY780 se localizaban principalmente en el estómago, el ciego y las heces, aunque también se observaron trazas en el íleon y el yeyuno, lo que sugiere que, aunque una gran cantidad de NCs estaba siendo excretada, parte podría estar adherida o retenida en el intestino. Asimismo, se decidió analizar la fluorescencia en los pulmones, el hígado, los riñones y el bazo, ya que se trata de los principales tejidos en los que estudios previos han descrito que los diferentes nanomateriales pueden acumularse produciendo toxicidad crónica, toxicidad metabólica, inmunotoxicidad o incluso genotoxicidad ^{394,462}. Sin embargo, no se observó fluorescencia en ningún caso, por lo que podríamos pensar que las NCs no se incorporan al torrente sanguíneo y, por lo tanto, no pasan a la vía sistémica.

Aunque las imágenes no se muestran, pasadas 24 y 48 horas tras la administración de las NCs_DY780 no se observó fluorescencia en ninguno de los ratones, lo cual podría indicar que habían sido completamente eliminadas, ya que el fluoróforo DY-780 se encuentra unido de forma covalente a la superficie de las NCs, siendo poco probable que pueda ser liberado. Para corroborar esta hipótesis, se utilizó un segundo grupo control de ratones administrados por vía oral con la misma cantidad de fluoróforo libre que se había utilizado para la funcionalización de las NCs_DY780. En este caso, no fue detectado hasta que no se alcanzó una concentración 10 veces superior del mismo, lo cual podría ser debido o bien a su degradación bajo las condiciones gastrointestinales o a una mayor dispersión del fluoróforo en forma libre, lo que se traduce directamente en una menor intensidad de la señal.

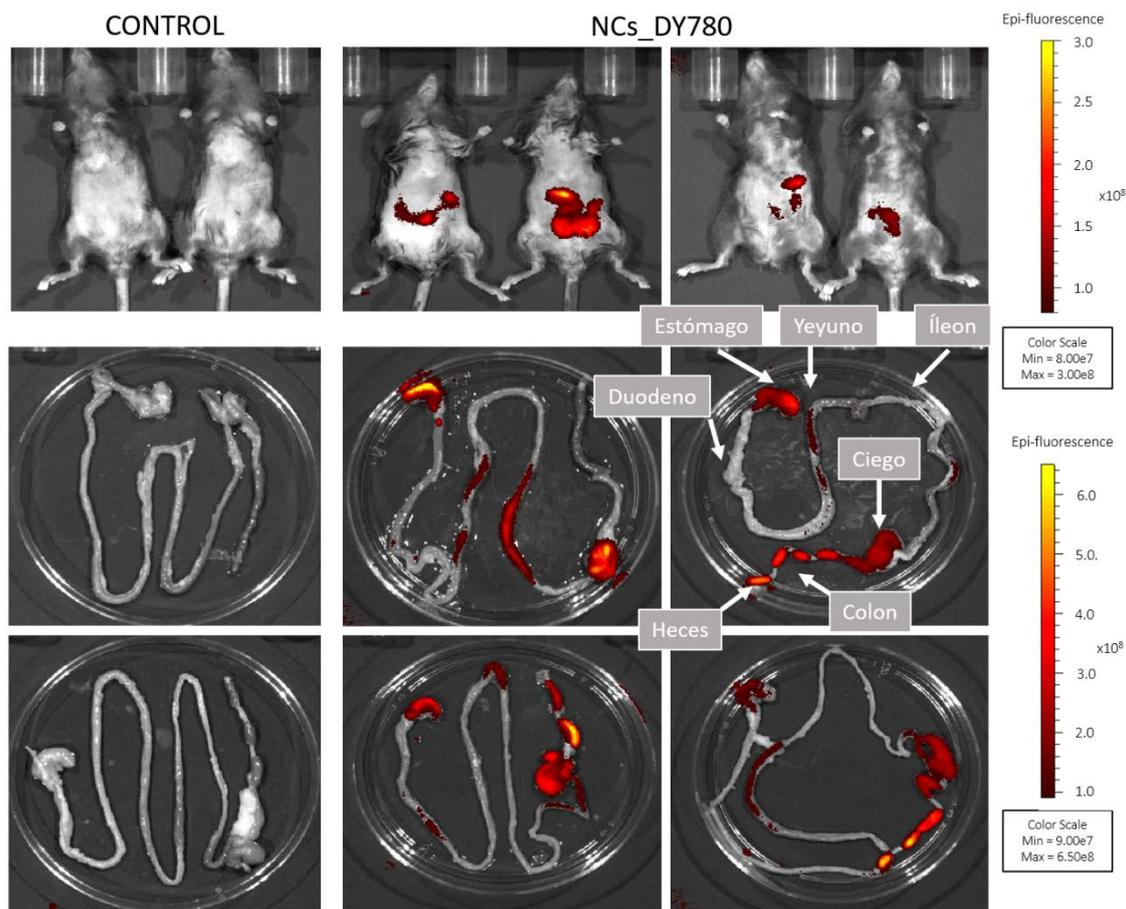


Figura 5.20.- Análisis de la biodistribución de las NCs_DY780 de quitosano. Se administraron 500 μg /ratón de NCs funcionalizadas con el fluoróforo DY-780 en ratones C57BL/6 WT de 6-8 semanas por vía oral mediante una sonda gástrica. Pasadas 4 horas tras la administración, los ratones fueron sacrificados mediante la inyección i.p. de una dosis letal de anestésico y rasurados para evitar que el pelaje oscuro interfiriera en la señal de fluorescencia. Se tomaron imágenes de los animales tras su eutanasia, y del paquete gastrointestinal tras su extracción, utilizando el equipo IVIS Lumina II con el filtro de excitación y emisión de ICG ($\lambda_{\text{ex}}=710/760$, $\lambda_{\text{em}}=810/875$ nm) seleccionado. Las imágenes fueron procesadas utilizando el Living Image Software. Cada grupo experimental está compuesto por diferente número de ratones, tal y cómo se refleja en la imagen.

Las AuNPs, gracias a sus propiedades ópticas y a su biocompatibilidad, también se han utilizado ampliamente como sistemas de vehiculización de moléculas, entre las que se incluyen los siARNs. Su encapsulación en capsulas poliméricas, ya sea a escala nano o micro, permite una mayor estabilización de las mismas frente al entorno biológico y, por lo tanto, una mejora en la eficacia del suministro de las sustancias terapéuticas^{463,464}. Sin embargo, de la misma forma que la encapsulación de las AuNPs presenta múltiples ventajas, la metodología de síntesis empleada no siempre permite un buen control de la dispersión del tamaño ni de la morfología de las partículas finalmente formadas. Frente a esta desventaja, el grupo del Dr. Jesús Martínez de la Fuente ha desarrollado una estrategia basada en la microencapsulación, ampliamente utilizada en el campo de la biomedicina debido a su alto potencial terapéutico frente a diversidad de

RESULTADOS

enfermedades ^{465,466}, mediante tecnología inkjet de las AuNPs (Figura 5.21.A.) ⁴⁶⁷. La tecnología inkjet, al tratarse de una tecnología automática, continua, fácilmente escalable y de alta eficiencia de encapsulación presenta unas características ideales para la microencapsulación ⁴⁶⁸. Las microesferas o microcápsulas (MCs) de quitosano formadas a través de esta tecnología se han descrito como altamente resistentes a la degradación frente al pH(2-10) y frente a diferentes medios fisiológicos, además de que no presentan citotoxicidad *in vitro* frente a los cultivos celulares ⁴⁶⁷.

Previamente a realizar el ensayo de biodistribución con las MCs de quitosano, comprobamos si, a pesar del incremento de su tamaño con respecto a las NCs, estas eran capaces de internalizarse en los MØ procedentes de medula ósea de ratón. Pasadas 4 horas tras la incubación de las AuNPs-MCs_Alexa647 con los MØ, tal y como se muestra en la Figura 5.21.B., se comprobó mediante microscopia de fluorescencia cómo la mayoría se localizaban en el interior de las células. Como control, se incubaron los MØ con las NCs_DY780 bajo las mismas condiciones, localizando a la mayoría en el interior de las células.

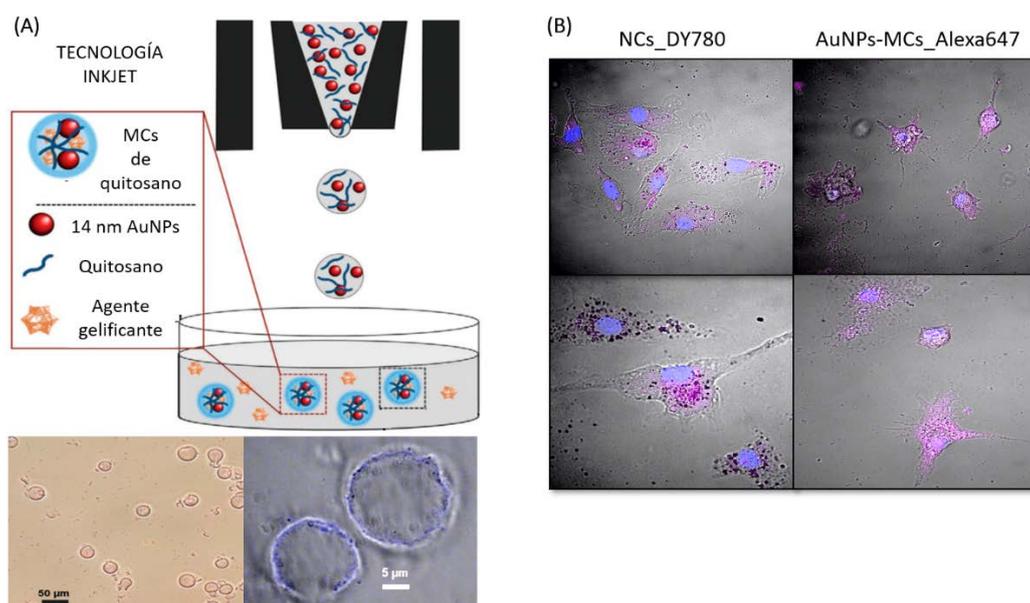


Figura 5.21.- Esquema de la metodología inkjet para la preparación de las AuNPs-MCs_Alexa647 y análisis de su internalización en macrófagos. (A) Las MCs son formadas por la gelificación iónica instantánea al entrar en contacto con el agente gelificante ácido fosfotúngstico (PTA). En la imagen de microscopia óptica de contraste se muestra el resultado de las AuNPs-MCs en agua (diámetro $34 \pm 4 \mu\text{m}$), mientras que en la imagen de microscopia confocal se muestran las AuNPs-MCs_Alexa647. Adaptación de ⁴⁶⁷. (B) Se obtuvieron MØ a partir de medula ósea de ratón y se sembraron sobre cubreobjetos, tal y como se describe en los Apartados 4.4.13.1 y 4.6.2., para ser incubados durante 4 horas a 37°C con 125 $\mu\text{g/ml}$ de NCs_DY780 y con 125 $\mu\text{g/ml}$ de AuNPs-MCs_Alexa647. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS, se fijaron con PFA 4% y se realizaron las preparaciones para su visualización mediante microscopia confocal. Se muestra una imagen representativa a 10X (margen superior) y 60X (margen inferior).

Continuando con el mismo procedimiento descrito para llevar a cabo el estudio de la biodistribución de las NCs_DY780, se administraron 20 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de AuNPs-MCs funcionalizadas con el fluoróforo Alexa647, cuya $\lambda_{\text{em}}=647$ nm tiene lugar en la región espectral del visible, dónde se recogen las señales de fondo correspondientes a la autofluorescencia de los tejidos. Por ello, fue necesario tener en cuenta algunos parámetros descritos por influir sobre el *background* como la alimentación, intentando minimizarlos lo máximo posible manteniendo a los animales con una dieta libre de alfalfa mínimo una semana antes del inicio del experimento. La dieta que se les suministra a los ratones de manera habitual, debido a su alto contenido en clorofila, componente fluorescente cuya emisión tiene lugar entre los 675 y 685 nm, está presente en muchos de los ingredientes de origen vegetal que componen los pellets ⁴⁶⁹.

Tal y como se muestra en la Figura 5.22.A., pasadas 4 horas tras la administración todos los ratones a los que se les habían administrado AuNPs-MCs_Alexa647 mostraron señal de fluorescencia en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, esto también sucedía con los ratones pertenecientes al grupo control a los que únicamente se les había administrado agua, por lo que parte de la señal que se observa corresponde al *background* de los propios animales. No obstante, si realizamos la comparación entre ambos grupos experimentales, podemos destacar que la intensidad de la señal es mayor en presencia de las AuNPs-MCs_Alexa647. Pasadas 24 horas tras la administración de las AuNPs-MCs_Alexa647, la señal de fluorescencia se redujo con respecto al grupo anteriormente descrito, lo cual podría indicar que estaban siendo eliminadas como sucedía con las NCs_DY780. Sin embargo, si nos fijamos en las imágenes pasadas 48 horas, la señal de nuevo se intensificó, lo cual podría deberse a la coprofagia, la ingesta de heces, ya que se trata de un comportamiento habitual en esta especie.

Una vez extraído el paquete intestinal de cada uno de los ratones, y tras la toma de imágenes en la región de emisión del fluoróforo, la intensidad de la señal de fondo era demasiado elevada y no permitía diferenciar la localización precisa de las AuNPs-MCs_Alexa647 en ninguno de los tiempos establecidos. Sin embargo, gracias a la determinación de la cantidad de oro presente en los diferentes tejidos mediante ICP-MS (Figura 5.22.B.), tal y como se describe en el Apartado 4.8.4., pudimos observar cómo pasadas 4 horas tras la administración de las AuNPs-MCs_Alexa647, la mayoría de ellas se localizaban en el estómago y en el colon, aunque también se detectaron trazas en el íleon. Además del grupo control al que se le había administrado agua, para este ensayo de biodistribución se decidió incluir un tercer grupo experimental con AuNPs sin encapsular. Se cuantificó la cantidad de AuNPs que habían sido internalizadas en las MCs y se

RESULTADOS

administró esta misma concentración (20µg/ratón) para analizar su localización mediante el mismo procedimiento experimental. Pasadas 4 horas tras la administración de las AuNPs pudimos ver cómo, de la misma forma que ocurría con las AuNPs-MCs_Alexa647, se detectó un alto contenido en oro en el estómago. Sin embargo, en el resto de los tejidos apenas se detectó su presencia, lo cual podría deberse a que cuando las AuNPs se encuentran internalizadas en las MCs, el tiempo de retención se incrementa en la zona del colon gracias a las propiedades mucoadhesivas del quitosano.

Pasadas 24 horas tras la administración, ninguno de los tejidos analizados procedentes de los diferentes grupos experimentales contenía oro, por lo que tanto las AuNPs encapsuladas como las AuNPs sin encapsular podrían haber sido eliminadas por completo del organismo. Para corroborar esta hipótesis, además de realizar la extracción de los tejidos, tras la eutanasia de los animales también se extrajo la sangre total mediante punción cardiaca y se analizó su contenido en oro. Ninguna de las muestras de sangre analizadas resultó positiva en la determinación.

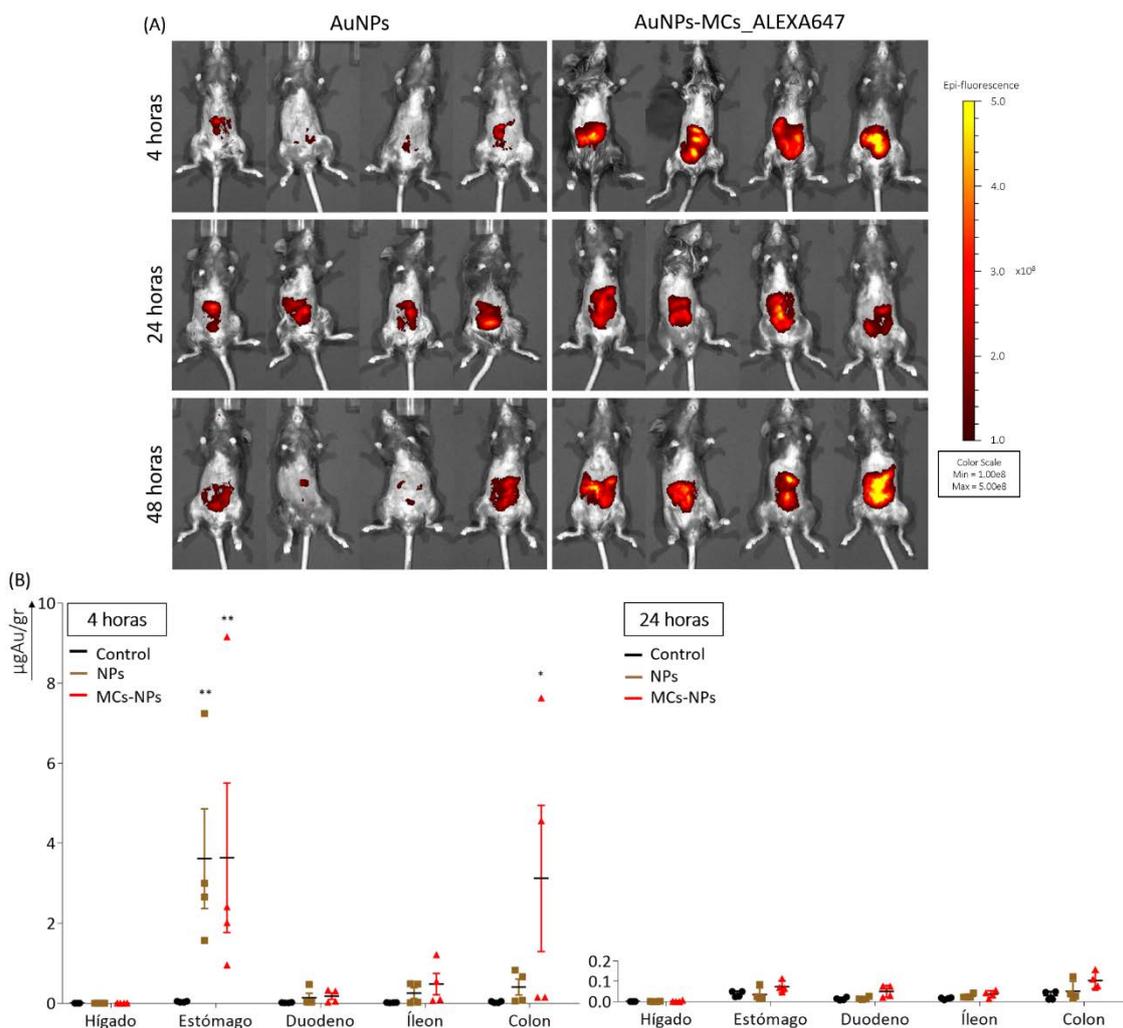


Figura 5.22.- Análisis de la biodistribución de las MCs de quitosano. Se administraron 20 µg/ratón de las AuNPs-MCs funcionalizadas con el fluoróforo Alexa647 en ratones C57BL/6 WT de 6-8 semanas por vía oral mediante una sonda gástrica. Pasadas 4, 24 y 48 horas tras la administración, los ratones fueron sacrificados mediante la inyección i.p. de una dosis letal de anestésico y rasurados para evitar que el pelaje oscuro interfiriera en la señal de fluorescencia. Cada grupo experimental está compuesto por una N=4. (A) Se tomaron imágenes de los animales tras su eutanasia, y del paquete gastrointestinal tras su extracción, utilizando el equipo IVIS Lumina II con el filtro de excitación y emisión de Cy5.5 ($\lambda_{exc}=615/665$, $\lambda_{em}=695/770$ nm) seleccionado. Las imágenes fueron procesadas utilizando el Living Image Software. (B) Se procedió a la extracción de los diferentes tejidos (hígado, estómago, duodeno, íleon y colon), y tras haber sido pesados, se procedió a su quemado y digestión, tal y como se describe en el Apartado 4.8.4., para la determinación de la concentración de oro. Los gráficos representan la media \pm SEM de un único experimento independiente. El análisis estadístico se realizó mediante un t test de Student, donde * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Finalmente, además del análisis de la biodistribución de las NCs_DY780 y las AuNPs-MCs_Alexa647, durante el ensayo se controló el estado de los ratones mediante su peso, apariencia y nivel de actividad. Como se observa en la Figura 5.23., las NCs_DY780 produjeron un pequeño descenso en el peso de algunos ratones con respecto al grupo control pasadas 48 horas

RESULTADOS

tras su administración, lo cual podría ser un indicativo de toxicidad sobre lo que se debería de profundizar mediante la realización de experimentos complementarios.

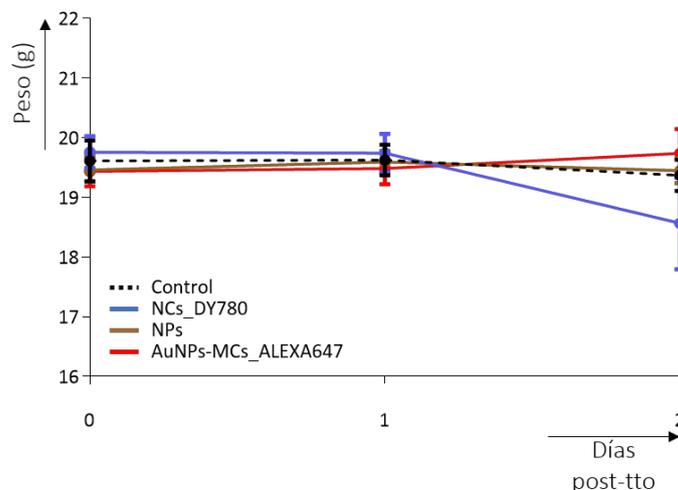


Figura 5.23.- Análisis de la toxicidad de las NCs y MCs administradas para el estudio de biodistribución. Se administraron 500 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de NCs_DY780 y 20 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de AuNPs-MCs_Alexa647 en ratones C57BL/6 WT de 6-8 semanas por vía oral mediante una sonda gástrica. El peso de los ratones fue controlado desde el inicio del experimento hasta el sacrificio de los animales a los diferentes tiempos estipulados (4, 24 y 48 horas). Cada grupo experimental está compuesto por una N=4. La gráfica representa la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

5.2.5. Discusión

La relación entre inflamación crónica y carcinogénesis fue propuesta por primera vez por Rudolf Virchow en 1863 al observar un infiltrado leucocitario en los tumores. Posteriormente, en el año 2011, Hanahan y Weinberg identificaron que la inflamación crónica, junto con la inestabilidad genética, contribuyen a la consolidación de los tumores, características que forman parte de los denominados *hallmarks* del cáncer^{470,471}. En la actualidad, existen numerosas evidencias documentadas acerca del vínculo entre inflamación y cáncer, siendo el CCR uno de los mejores ejemplos de un tumor estrechamente asociado con inflamación crónica^{472,473}. El CCR es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo, tratándose del tercer cáncer más comúnmente diagnosticado, cuyo tratamiento farmacológico es poco efectivo, por lo que una mejor comprensión de los mecanismos que intervienen en la progresión del CCR podría conducir a una mejora en el desarrollo de nuevas terapias.

La *gzmA*, además de estar implicada en sepsis, tal y como se describía en el Apartado 1.2.4., ha sido implicada en la iniciación y el desarrollo del CCR de origen inflamatorio⁴¹⁶. Estudios previos han demostrado un incremento de linfocitos infiltrantes con expresión de la *gzmA* en

pacientes con EII ²²³ o un aumento del mRNA de la *gzmA* en pacientes con UC ⁴⁷⁴, ambas patologías relacionadas con un mayor riesgo de desarrollo de CCR. Asimismo, recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha evidenciado la existencia de una correlación entre la expresión de la *gzmA* y la expresión de diversos genes inflamatorios en muestras de pacientes con CCR ⁴¹⁶. Por lo que, teniendo en cuenta la participación de la *gzmA* en este tipo de procesos inflamatorios, una de las propuestas para este trabajo de tesis, fue la inhibición selectiva de la expresión de la *gzmA*, manteniendo intacta la respuesta inflamatoria protectora, para la prevención y el tratamiento del CCR, evitando los posibles efectos adversos que provocan los actuales tratamientos inmunosupresores.

Desde que Fire y Mello descubrieron la capacidad del ARN para silenciar la expresión génica mediante la degradación del mRNA en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* en 1998 ⁴⁷⁵, el interés por el siARN como herramienta para el tratamiento de una gran diversidad de enfermedades, entre las que se incluye el cáncer, ha aumentado exponencialmente ⁴⁷⁶. Incluso algunos estudios previos han demostrado que puede darse un efecto sinérgico entre los tratamientos de quimioterapia convencionales y la administración de siARNs específicos antitumorales ^{477,478}. En nuestro caso, los primeros resultados obtenidos acerca del silenciamiento de la *gzmA* mostraron que puede llegar a reducirse su expresión *in vitro* entre un 30 y un 70% aproximadamente en función del siARN empleado. Sin embargo, es preciso tener en cuenta que, para conseguir un silenciamiento *in vivo* eficiente, el siARN debe de cumplir con una serie de requisitos, como no degradarse en condiciones fisiológicas o ser capaz de atravesar una serie de barreras biológicas. Debido a la dificultad que esto supone, uno de los componentes básicos en la terapia génica son los llamados vectores, sistemas diseñados para la transferencia del material genético en la célula diana.

Existen una gran variedad de vectores distintos, generalmente clasificados en dos grandes subgrupos: virales y no virales. Recientemente, dentro de los vectores no virales, se han desarrollado diferentes estrategias para lograr la vehiculización del siARN hacia el lugar donde su acción es requerida, siendo una de ellas el uso de polímeros catiónicos gracias a su habilidad para interactuar con el ARN cargado negativamente mediante interacción electrostática, lo que favorece la formación de complejos estables, y a su capacidad para atravesar las membranas celulares ⁴⁷⁹. El control de la química de la partícula hace posible la obtención de sistemas de liberación continuada, así como las propiedades de su superficie influyen sobre la interacción con los sistemas biológicos. El quitosano es uno de los polímeros biocompatibles de origen natural

RESULTADOS

que se ha utilizado más frecuentemente para la administración oral de diversidad de moléculas, protegiéndolas contra la degradación durante su paso por el tracto gastrointestinal y facilitando su absorción en el intestino, ya que debido a su carga positiva el quitosano posee la capacidad de abrir las uniones estrechas entre las células del epitelio intestinal, de manera transitoria y reversible, aumentando la permeabilidad ⁴⁸⁰, así como el tiempo de retención gracias a sus propiedades mucoadhesivas.

Nuestros resultados *in vitro* demostraron que las NCs de quitosano fueron eficientemente internalizadas en un intervalo de tiempo relativamente corto en el interior de las distintas poblaciones celulares de interés, sin mostrar toxicidad sobre las mismas. Sin embargo, no se logró alcanzar el silenciamiento génico de la *gzmA* mediante el uso de los nanocomplejos que contenían el siARN anti-*GzmA*. Es importante destacar que, aunque estudios previos han descrito los principales parámetros a tener en cuenta a la hora de sintetizar estos complejos, ya que pueden influir sobre la eficiencia del silenciamiento génico, existe cierta controversia en los resultados obtenidos entre los diferentes grupos. Algunos de estos parámetros son: el grado de desacetilación o el peso molecular del quitosano, los cuales permiten aumentar la carga positiva del polímero y, por lo tanto, mejorar la eficiencia de transfección; la relación N/P (N: grupos amino del quitosano; P: grupos fosfato del siARN) que influye directamente sobre el potencial zeta de la NC, que en el caso de ser altamente positivo favorece la estabilidad coloidal y mejora la absorción, aunque un exceso de quitosano también podría conducir a una mayor citotoxicidad; o el método de síntesis de los complejos siARN-NCs, el cual juega un papel clave en el tamaño de las partículas formadas, así como en la estabilidad y el grado de internalización de las mismas ^{369,481}.

Asimismo, la farmacocinética y la biodistribución también son parámetros relevantes a la hora de diseñar y testar nuevos nanomateriales, ya que su efectividad depende de que alcancen el tejido diana y su toxicidad de si se acumulan en tejido sano. Nuestros resultados *in vivo* mostraron como las NCs y las MCs de quitosano permiten actuar de forma localizada aumentando el tiempo de retención en la zona del intestino, eliminándose por completo del organismo sin llegar a producirse su integración en la vía sistémica, lo cual disminuye el riesgo de toxicidad. Estudios previos han descrito que la acumulación de NPs en el organismo puede llegar a provocar diversos efectos secundarios ⁴⁸²⁻⁴⁸⁴. Es por ello por lo que tanto las NCs como las MCs de quitosano empleadas en este trabajo podrían ser consideradas como vehículos adecuados para el tratamiento de liberación dirigida frente a diversas enfermedades intestinales como el CCR.

5.3. Estudio del efecto de las nanopartículas de oro *in vitro* e *in vivo*

5.3.1. Estudio del efecto de las AuNPs sobre la variación en la expresión de citocinas proinflamatorias en macrófagos M1 y M2 *in vitro*

A lo largo de la respuesta inflamatoria tiene lugar la participación de MØM1, predominantes durante las etapas iniciales del proceso, y de MØM2, cuyo número aumenta en etapas más tardías promoviendo la resolución de la inflamación¹⁴⁶, tal y como se describía en el Apartado 1.2.3.1. Es por ello por lo que, para el estudio del efecto de las AuNPs sobre la respuesta inflamatoria en MØ, nos planteamos utilizar MØM1 y MØM2. Para ello, se utilizaron los factores GM-CSF y M-CSF, ya que ambos contribuyen a la supervivencia y a la proliferación celular, sin embargo, ejercen acciones diferentes durante la polarización de los MØ. Mientras GM-CSF promueve la generación de MØM1 (GM-BMDMs), caracterizados por ser productores de citocinas proinflamatorias, además de por una alta capacidad presentadora de antígeno y actividad tumoricida, el M-CSF produce MØM2 (BMDMs), que liberan IL-10 en respuesta a agentes patógenos, poseen alta capacidad fagocítica y actividad protumoral⁴⁸⁵.

Previamente a evaluar el efecto de las AuNPs sobre la expresión de citocinas proinflamatorias, se decidió verificar si la diferenciación a MØ se había producido correctamente mediante el análisis de citometría de flujo de determinados marcadores extracelulares (Anexo II). Para ello, una vez extraídos los monocitos de la medula ósea de los ratones, se colocaron en cultivo durante 7 u 8 días con el medio adecuado en función del fenotipo a obtener, tal y como se muestra en la Figura 5.24.A., y posteriormente, se realizaron los marcajes con F4/80 y CD11b^{486,487}. Las células diferenciadas mostraron una población doble positiva, característica de MØ, alcanzando un 72,2% en el caso de los MØM1 y un 93% en el caso de los MØM2 (Figura 5.24.B.). Como control, también se analizó la expresión en monocitos recién extraídos, siendo el 99% de la población resultante doble negativa, y en MØM0 o células sin completar su diferenciación, cultivadas con M-CSF en ausencia del estímulo de la IL-4, obteniendo únicamente un 29,3% de células doble positivas. Asimismo, para diferenciar entre los distintos fenotipos, se realizaron los marcajes con MHCII y CD206 sobre la población preseleccionada F4/80⁺CD11b⁺^{488,489}. Como se muestra en la Figura 5.24.C., los resultados obtenidos fueron acordes a lo descrito en la bibliografía, obteniendo una mayor expresión de MHCII para los MØM1 y una mayor expresión

RESULTADOS

de CD206 para los MØM2, corroborando de esta forma que los protocolos empleados para la diferenciación de los diferentes MØ eran los adecuados.

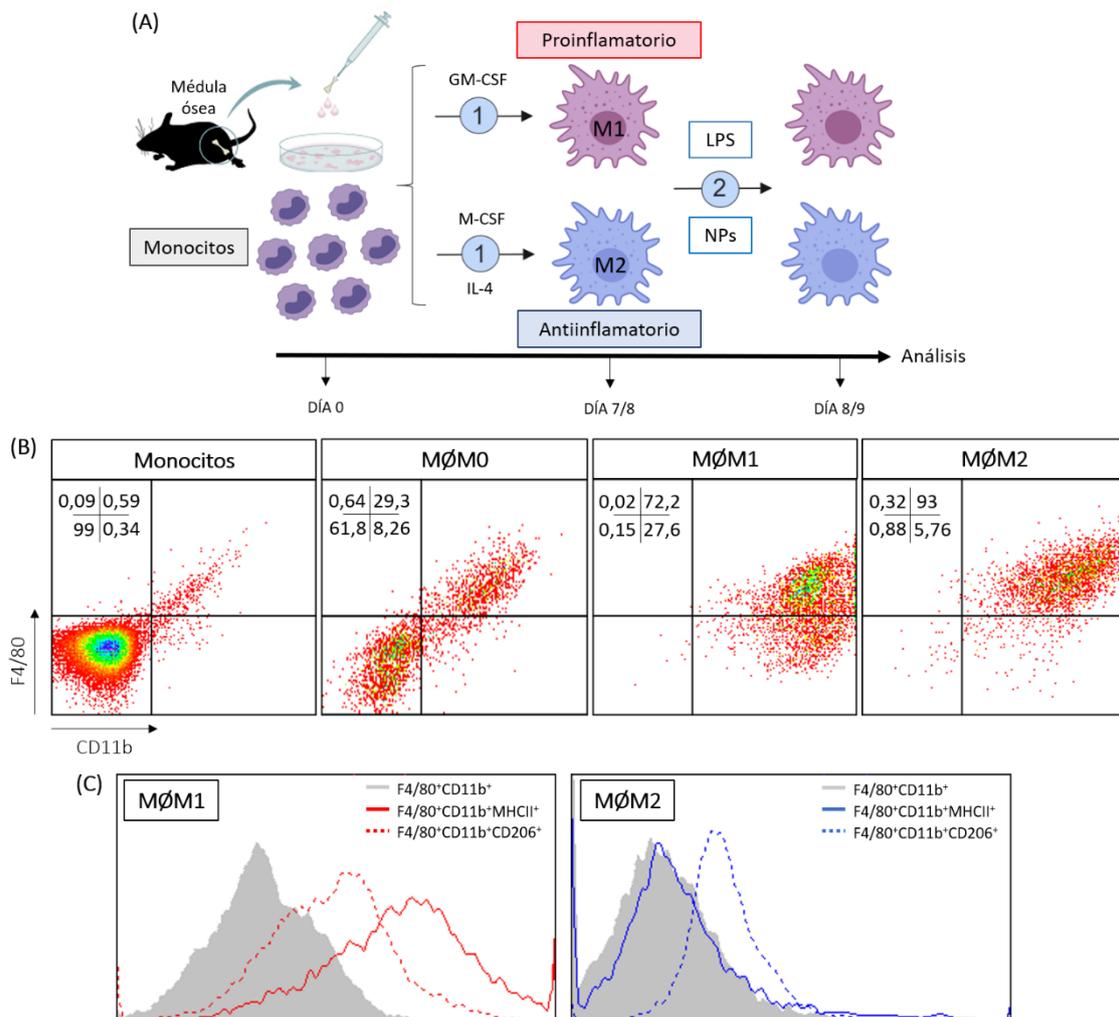


Figura 5.24.- Fenotipado de macrófagos: M1 y M2. (A) Se extrajo la médula ósea de ratones C57BL/6 WT de 6-8 semanas. Las células obtenidas se sembraron a una densidad de 10^6 células/ml en placas de cultivo y se mantuvieron durante 7-8 días con el medio correspondiente en función del fenotipo a obtener, tal y como se indica en el Apartado 4.4.13. Pasado este tiempo, las células fueron despegadas y a continuación, se sembraron en una placa de 96 pocillos para ser incubadas con LPS a diferentes concentraciones (1 y 100 ng/ml), 100 μ g/ml de AuNPs o una combinación de ambas durante 6 y 24 horas. (B) Tras la diferenciación completa de los MØ, previamente a ser incubados con LPS o AuNPs, las células fueron despegadas para su marcaje con F4/80, CD11b, MHCII y CD206 y su posterior análisis mediante citometría de flujo. Dot plots representativos del porcentaje de células positivas F4/80⁺ CD11b⁺ para cada uno de los fenotipos de MØ. Monocitos recién extraídos y células cultivadas con M-CSF sin estimular con la IL-4, se utilizaron como referencia para analizar el incremento en la expresión de los marcadores seleccionados. Los números en la esquina superior muestran el porcentaje de células correspondientes a cada cuadrante. (C) Tras la diferenciación completa de los MØ, previamente a ser incubados con LPS o AuNPs, las células fueron despegadas para su marcaje con F4/80, CD11b, MHCII y CD206 y su posterior análisis mediante citometría de flujo. Histogramas representativos de la intensidad de expresión de MHCII y CD206 sobre la población preseleccionada de células F4/80⁺ CD11b⁺ para cada uno de los fenotipos de MØ.

Una de las grandes ventajas de las NPs es que presentan una gran versatilidad a la hora de ser diseñadas, permitiendo aportarles las características deseadas mediante lo que se conoce como funcionalización tras su síntesis. Sin embargo, la modificación de la superficie de las NPs, además de afectar a su estabilidad, también puede influir sobre otros parámetros como la toxicidad. Por consiguiente, se decidió testar conjuntamente AuNPs que diferían en su funcionalización, todas ellas procedentes del grupo del Dr. Jesús Martínez de la Fuente. Asimismo, y aprovechando que múltiples estudios previos han descrito la capacidad del LPS para inducir una potente respuesta inmune innata, acompañada de una alta producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α ^{490,491}, se planteó utilizar la combinación de esta endotoxina con las AuNPs para poder estudiar posibles incrementos o descensos de la respuesta inflamatoria.

En primer lugar, se comprobó que las dosis seleccionadas para experimentos posteriores, tanto de AuNPs como de LPS, no resultaban ser tóxica para los M ϕ mediante la realización de ensayos de MTT y el marcaje de 7-AAD junto con su posterior análisis mediante citometría de flujo, tal y como se describe en los Apartados 4.4.4. y 4.3.3.3. En ninguno de los casos se obtuvo una viabilidad inferior al 90%, considerándose así que se trataba de dosis adecuadas. Además, todos los lotes de AuNPs empleados para la realización de los diferentes ensayos que se muestran a lo largo de este apartado fueron testados, comprobando así que estuvieran libres de endotoxinas bacterianas.

Los primeros resultados acerca de la expresión de IL-1 β , IL-6 y TNF- α sobre M ϕ M1 (Anexo III), indicaban en la mayoría de los casos que el perfil de expresión era similar para todos los tipos de AuNPs, en ausencia de LPS o en combinación con bajas concentraciones del mismo. Sin embargo, se observaron pequeñas diferencias que nos llevaron a seleccionar para experimentos posteriores aquellas AuNPs recubiertas con PEG-N₃ y PEG-COOH con el 100% de la superficie saturada (Figura 5.25.), ya que podrían ser consideradas como las más inflamatorias, además de ser las más estables en solución.

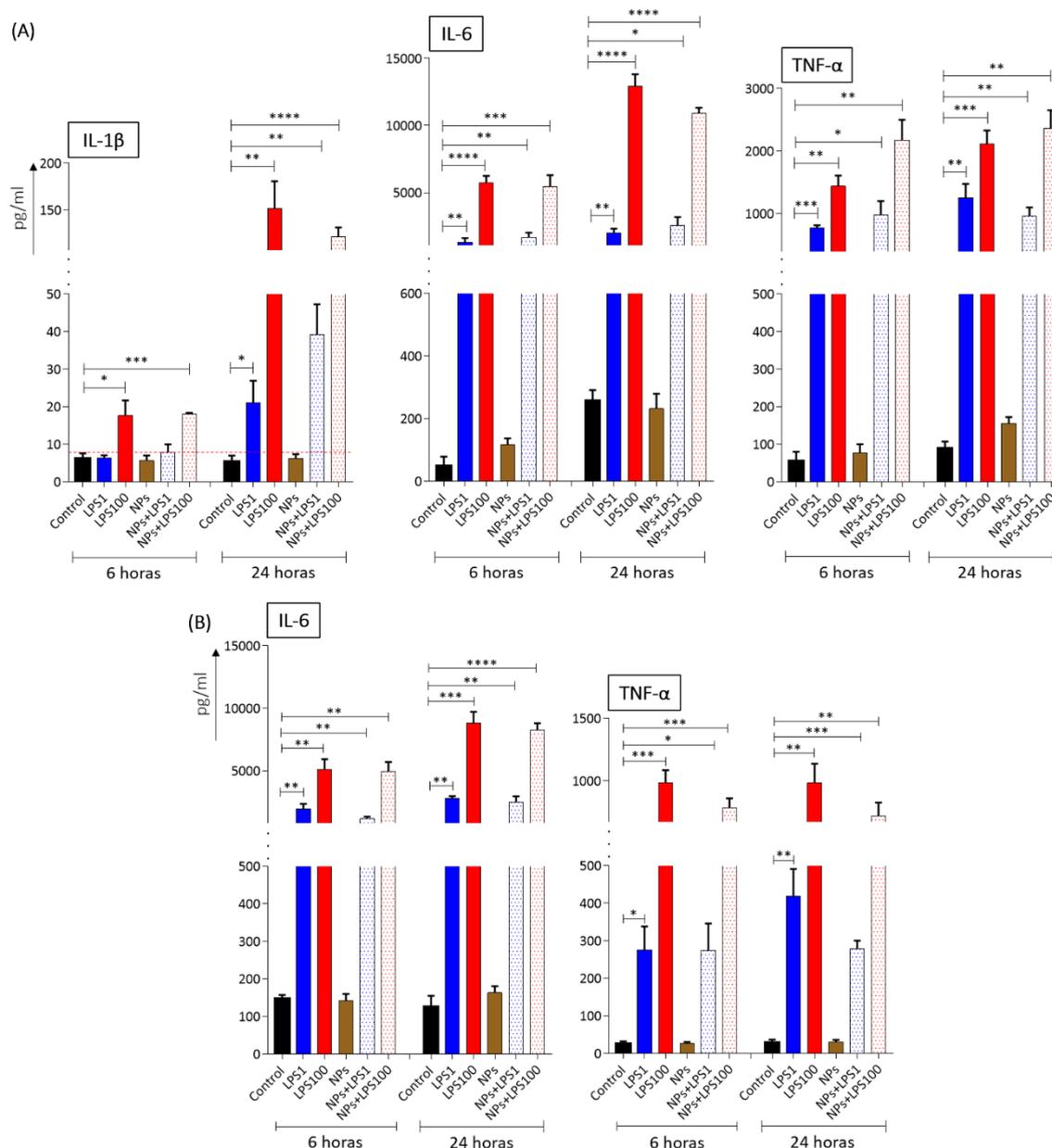


Figura 5.26.- Análisis del efecto de las AuNPs sobre la expresión de citocinas proinflamatorias en macrófagos M1 y M2. Se extrajo la médula ósea de ratones C57BL/6 WT de 6-8 semanas. Las células obtenidas se sembraron a una densidad de 10^6 células/ml en placas de cultivo y se mantuvieron durante 7-8 días con el medio correspondiente en función del fenotipo a obtener, tal y como se indica en el Apartado 4.4.13. Pasado este tiempo, las células fueron despegadas y a continuación, se sembraron en una placa de 96 pocillos para ser incubadas con LPS a diferentes concentraciones (1 y 100 ng/ml), 100 μ g/ml de AuNPs o una combinación de ambas durante 6 y 24 horas. La adición de LPS, independientemente de la concentración empleada, se realizó 1 hora antes que la adición de las AuNPs. Se recogieron los sobrenadantes y, tras su centrifugación para la eliminación de restos celulares, se cuantificaron los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α mediante ELISA en (A) M ϕ M1 y (B) M ϕ M2. La línea roja discontinua que aparece en el gráfico relativo a la expresión de IL-1 β hace referencia al límite de detección propio del método. Los gráficos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un t test de Student, donde * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Finalmente, con el objetivo de analizar el mecanismo a través del cual las AuNPs podrían alterar la respuesta inflamatoria mediada por el LPS a concentraciones altas, se decidió analizar

RESULTADOS

de nuevo la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α sobre M ϕ M1 en presencia del inhibidor de caspasa-1, proteasa encargada de proteolizar las formas inmaduras de las citocinas clave en la respuesta inflamatoria IL-1 β e IL-18¹²³. Como era de esperar, tal y como se observa en la Figura 5.27., al utilizar el inhibidor VX-765, los niveles de IL-1 β alcanzados con una dosis de 100 ng/ml de LPS se redujeron drásticamente. Sin embargo, en presencia de AuNPs y tras 24 horas de incubación, la reducción no fue tan drástica, recuperando así parte de la expresión. Con respecto a la IL-6, el inhibidor VX-765 también fue capaz de reducir la expresión inducida por la dosis de 100 ng/ml de LPS tras 6 y 24 horas de incubación, aunque en presencia de AuNPs esta inhibición se bloqueó, alcanzándose niveles elevados de IL-6. Por último, la producción de TNF- α no se vio alterada con el uso del inhibidor VX-765, aunque en presencia de AuNPs, sí que se produjo una reducción de la misma.

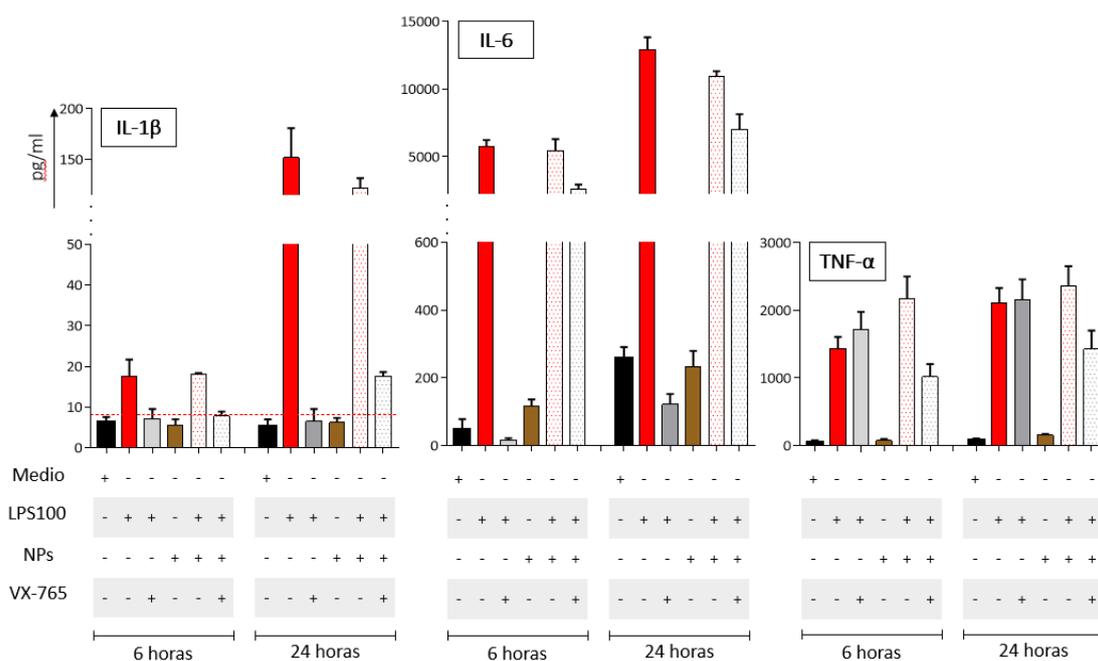


Figura 5.27.- Análisis del mecanismo a través del cual las AuNPs modulan la respuesta inflamatoria en macrófagos M1. Se extrajo la médula ósea de ratones C57BL/6 WT de 6-8 semanas. Las células obtenidas se sembraron a una densidad de 10⁶ células/ml en placas de cultivo y se mantuvieron durante 7-8 días con medio GM-CSF, tal y como se indica en el Apartado 4.4.13.1. Pasado este tiempo, las células fueron despegadas y a continuación, se sembraron en una placa de 96 pocillos para ser incubadas con LPS a diferentes concentraciones (1 y 100 ng/ml), 100 μ g/ml de AuNPs o una combinación de ambas durante 6 y 24 horas. La adición de LPS, independientemente de la concentración empleada, se realizó 1 hora antes que la adición de las AuNPs. Previamente, algunos grupos experimentales fueron preincubados 1 hora antes con el inhibidor de caspasa-1 (VX-765, 10 μ M). Se recogieron los sobrenadantes y, tras su centrifugación para la eliminación de restos celulares, se cuantificaron los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α mediante ELISA en M ϕ M1. La línea roja discontinua que aparece en el gráfico relativo a la expresión de IL-1 β hace referencia al límite de detección propio del método. Los gráficos representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

5.3.2. Estudio del efecto de las AuNPs sobre la maduración de células dendríticas *in vitro*

Las DCs representan una familia heterogénea de APCs con propiedad para inducir tolerancia en los linfocitos T o activarlos debido en parte a su estado de maduración. En estado inmaduro, las DCs muestran baja expresión en su superficie de moléculas MHC de tipo II, así como de moléculas co-estimuladoras tales como CD40, CD80 y CD86. Sin embargo, cuando las DCs se activan diferenciándose a DCs maduras, se produce un aumento significativo en la expresión de dichos marcadores ⁴⁹².

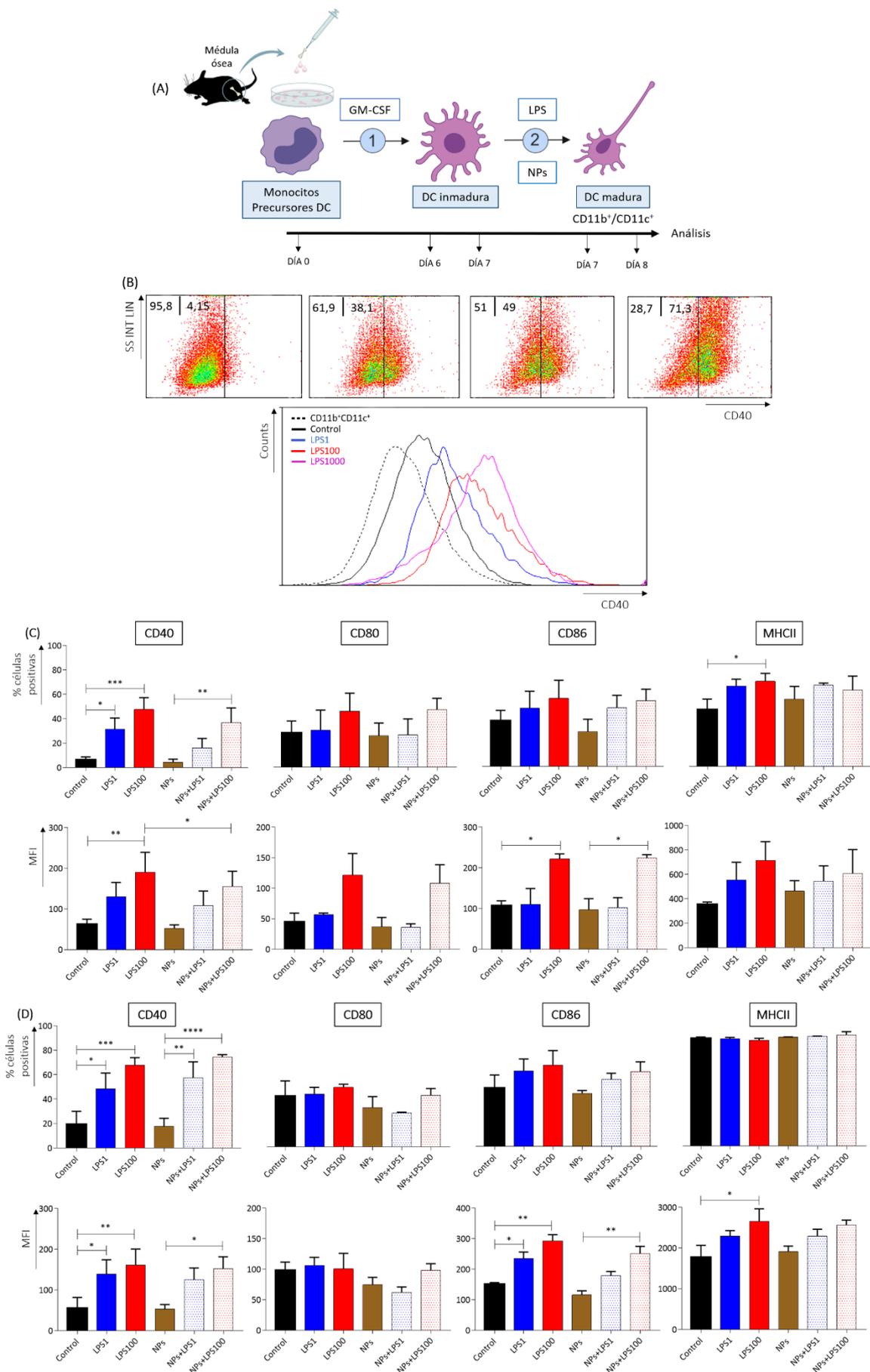
Estímulos como el LPS provocan la maduración de las DCs induciendo cambios en su fenotipo. Por ello, quisimos analizar la posible influencia de las AuNPs sobre la maduración de BMDCs, con y sin la estimulación del LPS (Figura 5.28.A.), mediante el cambio en la expresión de marcadores de superficie en la población preseleccionada de células CD11b⁺CD11c⁺ ⁴⁹³ (Anexo II). Cómo se puede observar en la Figura 5.28.B., a modo de ejemplo con CD40, al aumentar la concentración de LPS se produjo un incremento tanto del número de BMDCs positivas como de los propios niveles de expresión cuantificados a través de la MFI, algo que también ocurría con el resto de los distintos marcadores (Figura 5.28.C). El aumento de la expresión de los ligandos de co-estimulación CD40, CD80 y CD86 demostró que las BMDCs se encontraban en un estado maduro, mientras que el incremento de la expresión de MHCII señaló una mayor capacidad de presentación antigénica. De esta forma, se obtuvieron BMDCs especializadas en la generación de una respuesta inmune adaptativa ⁴⁹⁴. Aunque inicialmente se empleó la dosis de 1 µg/ml de LPS para la maduración de las BMDCs, esta concentración fue descartada del estudio, ya que a pesar de que ninguna de las concentraciones empleadas para el estudio manifestó toxicidad mediante el marcaje con 7-AAD, generó niveles de expresión tan elevados que imposibilitaban el poder observar posibles variaciones que las AuNPs pudiesen inducir.

Asimismo, tal y como se muestra en la Figura 5.28.D., se llevaron a cabo experimentos con BMDCs en distinto estadio de diferenciación. Destacar que, tras 7 días, tanto el porcentaje de células positivas como el nivel de expresión de los distintos marcadores en los diferentes grupos experimentales, incluyendo el grupo control, fueron incrementados con respecto a los obtenidos el día anterior, lo cual nos indica que las BMDCs en este caso habían aumentado su

RESULTADOS

grado de madurez. Además, en el caso de MHCII podemos observar como todas las células resultaron ser positivas independientemente del estímulo aplicado.

Con respecto al efecto de las AuNPs sobre las BMDCs, en ninguno de los casos por sí solas provocaron cambios morfológicos. Con respecto a su fenotipo, tras 6 días de diferenciación, se observó un descenso en el porcentaje de células positivas para CD86 y un incremento en la expresión de MHCII. Mientras que, tras 7 días, se produjo un descenso tanto del porcentaje de células positivas como de los niveles de expresión para CD80 y CD86. Ninguno de los cambios señalados resultó ser significativo. Finalmente, las combinaciones de AuNPs con LPS provocaron ligeros descensos en la mayoría de los casos sobre la expresión de las moléculas de superficie de las BMDCs en relación a sus respectivos controles.



RESULTADOS

Figura 5.28.- Análisis del efecto de las AuNPs sobre la maduración de células dendríticas. (A) Se extrajo la médula ósea de ratones C57BL/6 WT de 6-8 semanas. Las células obtenidas se sembraron a una densidad de 10^6 células/ml en placas de cultivo y se mantuvieron durante 6-7 días con RPMI completo enriquecido con sobrenadante de células X-63Ag8653 (Apartado 4.4.12.). Pasado este tiempo, se recogió el sobrenadante de cultivo con las células en suspensión y a continuación, se sembraron en una placa de 96 pocillos para ser incubadas con LPS a diferentes concentraciones (1, 100 y 1000 ng/ml), 100 μ g/ml de AuNPs o una combinación de ambas durante 24 horas. La adición de LPS, independientemente de la concentración empleada, se realizó 1 hora antes que la adición de las AuNPs. Finalmente, se procedió al marcaje de CD11b, CD11c, CD40, CD80, CD86 y MHCII y a su posterior análisis mediante citometría de flujo. (B) Experimento representativo del porcentaje de células positivas y el nivel de expresión de CD40, en función de la concentración de LPS utilizada para estimular las BMDCs. Las células no estimuladas se utilizaron como referencia para analizar el incremento en la expresión. Los números en la esquina superior muestran el porcentaje de células correspondientes a cada cuadrante. (C) Tras 6 días de diferenciación y (D) tras 7 días de diferenciación; se analizaron los porcentajes de BMDCs positivas y los niveles de expresión de CD40, CD80, CD86 y MHCII para los distintos grupos experimentales: LPS (1 y 100 ng/ml), AuNPs (100 μ g/ml) y su combinación. Como control se utilizaron BMDCs sin estimular. Los gráficos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un t test de Student, donde * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001.

5.3.3. Estudio del efecto de las AuNPs sobre el crecimiento tumoral del melanoma murino B16 *in vivo*

Continuando con el estudio de los nanomateriales, y más concretamente de las AuNPs, se quiso comprobar la capacidad de las mismas para ejercer un efecto inmunomodulador *in vivo* en ausencia y presencia de LPS, sobre las diferentes poblaciones inmunológicas que conforman el TME. Para ello, se usó un modelo de tumor sólido subcutáneo que permitiera evidenciar las posibles variaciones mediante su seguimiento y posterior análisis.

Previamente a evaluar el efecto de las AuNPs sobre el crecimiento de los tumores *in vivo*, se testó la toxicidad y el efecto del LPS sobre el modelo de melanoma murino B16, puesto que es el modelo de melanoma metastásico más utilizado para estudios preclínicos⁴⁹⁵. Para ello, se inocularon por vía s.c. células B16 en ratones WT y, una vez los tumores comenzaron a desarrollarse de forma visible/palpable, se inyectó intratumoralmente LPS a diferentes concentraciones, tal y cómo se muestra en la Figura 5.29.A. En los ratones control se administró PBS con el objetivo de que la manipulación de los tumores fuera lo más homogénea posible, así como el estrés al que los ratones deben de someterse durante el procedimiento.

A partir del “día 0”, considerado de esta forma por ser el inicio del tratamiento, se llevó a cabo el seguimiento del desarrollo tumoral. Tal y cómo se observa en la Figura 5.29.B., mientras que los diferentes ratones del grupo control presentaron un crecimiento tumoral continuo, los ratones a los que se les había administrado LPS mostraron o bien un retardo en el crecimiento o

un descenso del volumen en función de la concentración. La administración de 1 µg de LPS provocó que el crecimiento de los tumores, aunque también continuo, fuera más lento en comparación con el grupo control, mientras que la dosis de 5 µg de LPS hizo que en algunos casos se produjera una remisión completa de los mismos. Aunque parece paradójico, el crecimiento de los tumores al utilizar 10 µg de LPS, en lugar de tener un efecto similar al descrito anteriormente, fue semejante al obtenido mediante la concentración más baja de LPS (1 µg). Finalmente, a la concentración más alta testada, correspondiente a 50 µg de LPS, los tumores sufrieron ulceración, produciéndose la remisión de todos ellos. Exceptuando a la concentración más baja de LPS, en el resto de las dosis administradas se observó un pico de incremento tras las primeras 24-48 horas tras la inoculación de la endotoxina, que podría deberse al inicio de la reacción inflamatoria.

Además del seguimiento del desarrollo tumoral, a lo largo de todo el procedimiento experimental se controló el estado de los ratones mediante su peso, apariencia y nivel de actividad. De esta forma, se evidenció que el LPS no mostraba toxicidad a las dosis administradas ya que no se observaron cambios con respecto al grupo control.

RESULTADOS

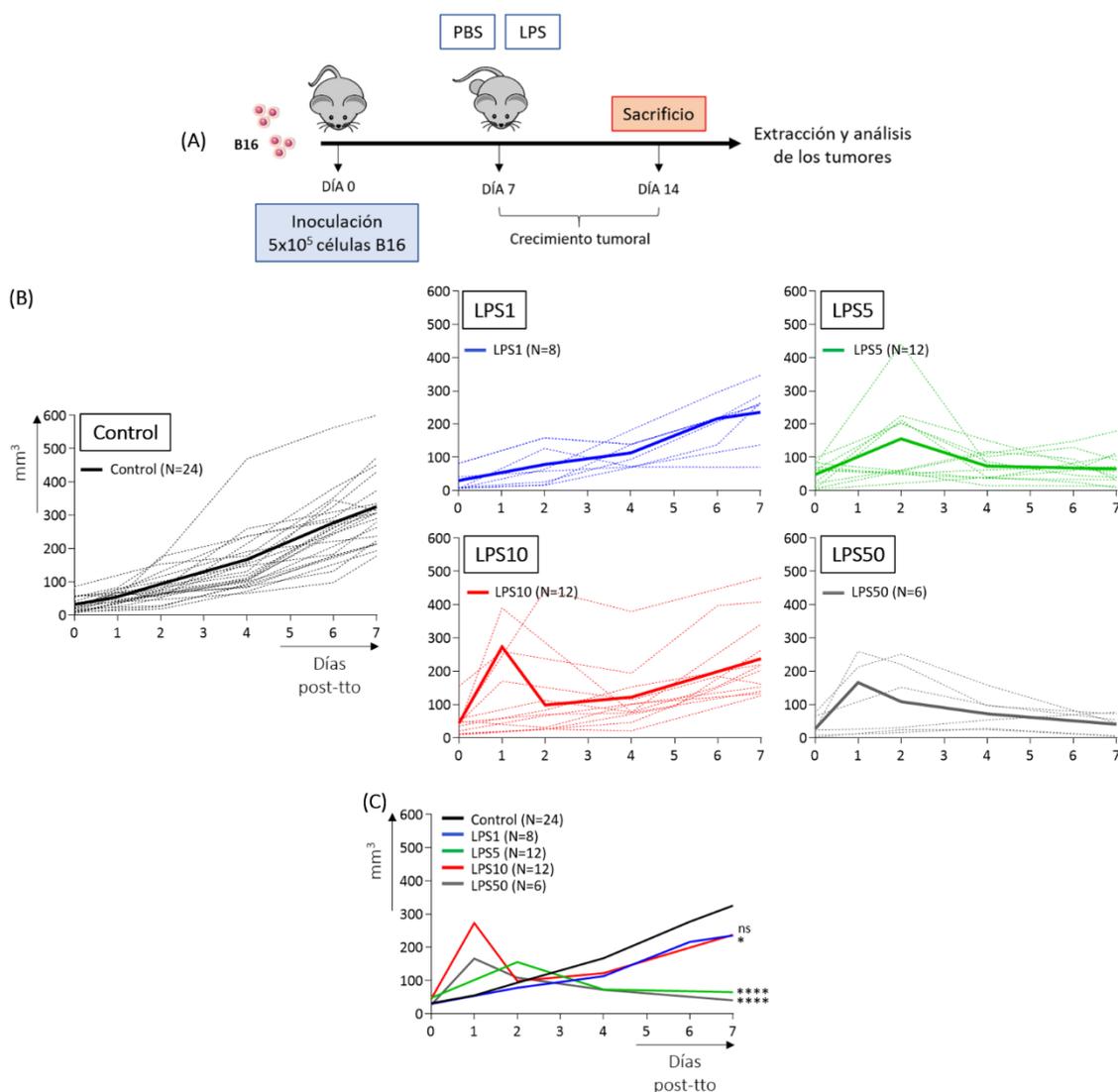


Figura 5.29.- Análisis del efecto del LPS sobre el crecimiento de tumores subcutáneos B16. (A) Se inocularon 5×10^5 células B16 en el flanco derecho de ratones C57BL/6 WT. Tras 7 días, una vez los tumores comenzaron a crecer, se inyectaron intratumoralmente diferentes concentraciones de LPS en un volumen final de 100 μ l y se observó el desarrollo tumoral durante los siguientes 7 días. Como control se inyectó el mismo volumen de PBS. (B) Se muestran en punteado las curvas de crecimiento a partir del “día 0”, momento en el que se inicia el tratamiento con diferentes concentraciones de LPS (1, 5, 10 y 50 μ g), para cada uno de los tumores de forma independiente. El volumen se calculó mediante la fórmula $L \cdot A \cdot H$ según se indica en el Apartado 4.8.5. Asimismo, en cada uno de los gráficos, mediante una línea continua de mayor grosor se muestra la media, resultado de los diferentes tumores. (C) Se muestran únicamente las medias de los diferentes grupos. Cada grupo experimental está compuesto por diferente número de ratones, tal y como se refleja en el gráfico, de un mínimo de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de comparaciones múltiples de Dunnett entre las diferentes concentraciones de LPS y el grupo control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

A continuación, y como se muestra en la Figura 5.30.A., se siguieron las mismas pautas de administración, pero en este caso utilizando las AuNPs en ausencia o en combinación de las distintas dosis de LPS. La concentración utilizada de AuNPs en todos los casos fue de 2 mg, una concentración fija establecida en función de la posibilidad de concentrar al máximo las AuNPs sin que estas pierdan su estabilidad y el máximo volumen permitido para la administración intratumoral. Una vez administradas las AuNPs a "día 0", se realizó el seguimiento del crecimiento tumoral y se observó un incremento del desarrollo en comparación con el grupo control, el cual no resultó significativo debido a la alta variabilidad entre los diferentes animales. Además, en la Figura 5.30.B. se observa como la presencia de AuNPs en las combinaciones testadas, provocó cambios en el crecimiento de los tumores en comparación con sus respectivos controles de LPS a las mismas concentraciones en ausencia de nanopartículas. Mientras que las combinaciones de 1 y 5 μg de LPS con AuNPs dieron lugar a un ligero incremento del crecimiento tumoral, la combinación de 10 μg mostró un descenso del mismo. De nuevo, la administración de 50 μg de LPS, en este caso combinados con AuNPs, provocó la ulceración y eliminación total de los tumores, por lo que esta dosis fue finalmente descartada en experimentos posteriores por mostrar toxicidad local sobre las propias células tumorales ⁴⁹⁶.

RESULTADOS

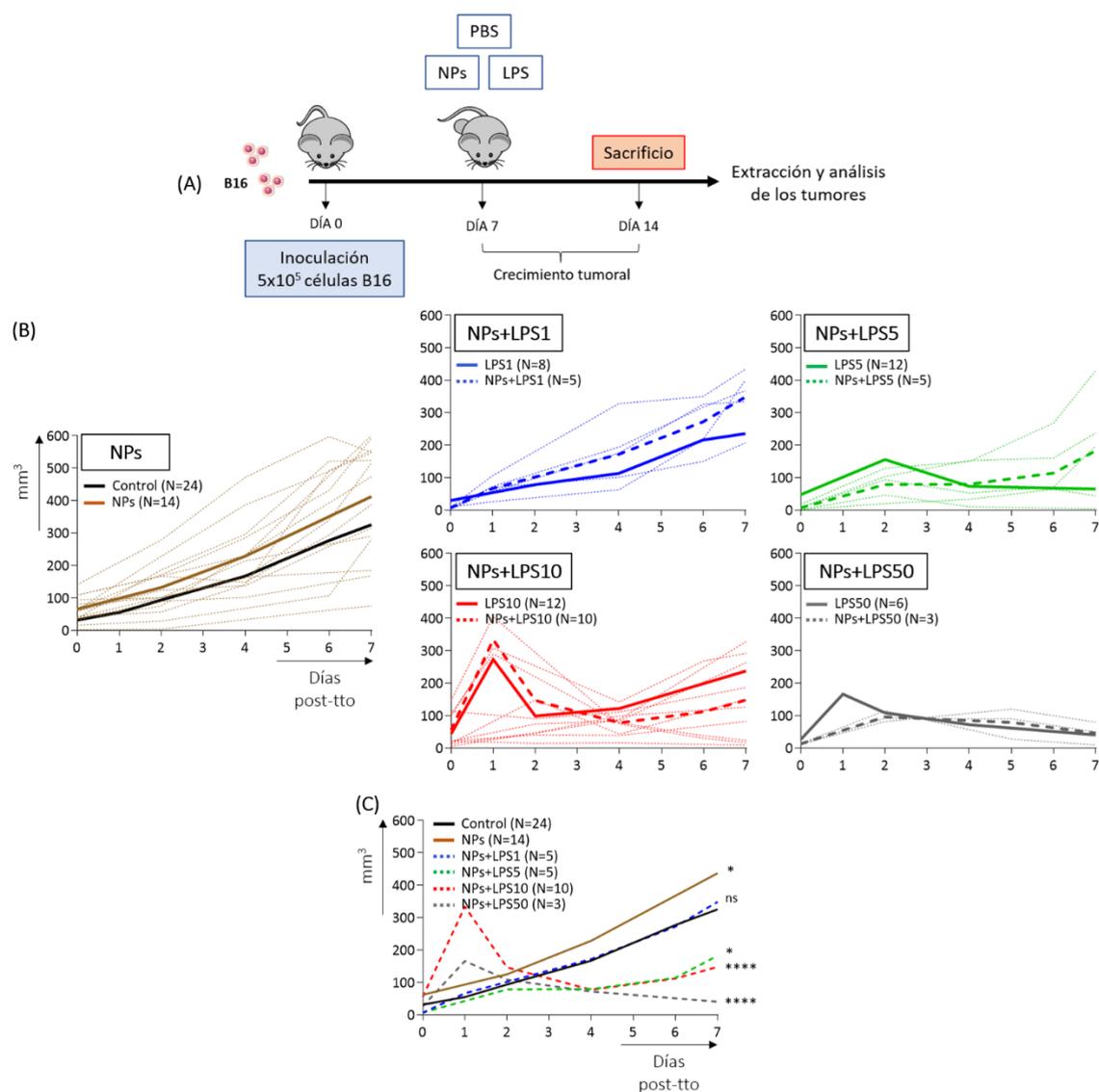


Figura 5.30.- Análisis del efecto de las AuNPs sobre el crecimiento de tumores subcutáneos B16. (A) Se inocularon 5×10^5 células B16 en el flanco derecho de ratones C57BL/6 WT. Tras 7 días, una vez los tumores comenzaron a crecer, se inyectó intratumoralmente una concentración fija de 2 mg de AuNPs en ausencia o en combinación de diferentes concentraciones de LPS en un volumen final de 100 μ l y se observó el desarrollo tumoral durante los siguientes 7 días. La administración de ambos compuestos se hizo de forma independiente, aunque simultánea. Como control se inyectó el mismo volumen de PBS. (B) Se muestran en punteado las curvas de crecimiento a partir del “día 0”, momento en el que se inicia el tratamiento con AuNPs y diferentes concentraciones de LPS (1, 5, 10 y 50 μ g), para cada uno de los tumores de forma independiente. El volumen se calculó mediante la fórmula $L \cdot A \cdot H$ según se indica en el Apartado 4.8.5. Asimismo, en cada uno de los gráficos, mediante una línea discontinua de mayor grosor se muestra la media, resultado de los diferentes tumores y mediante una línea continua se muestra la media de sus respectivos controles, resultados del análisis anterior. (C) Se muestran únicamente las medias de los diferentes grupos ensayados. Cada grupo experimental está compuesto por diferente número de ratones, tal y como se refleja en el gráfico, de un mínimo de 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de comparaciones múltiples de Dunnett entre las diferentes concentraciones de LPS y el grupo control. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

A la vista de los resultados obtenidos anteriormente (Figura 5.30.B.), la combinación de 10 μg de LPS con AuNPs fue la única que retardó el crecimiento de los tumores sin causar toxicidad y sin llegar a provocar la remisión de los mismos. Por ello, se decidió probar a realizar el mismo experimento con esta misma combinación de AuNPs y LPS, pero esta vez permitiendo a los tumores alcanzar el punto final humanitario correspondiente a 1 cm^3 (Figura 5.31.A.), con el objetivo de observar el desarrollo tumoral a largo plazo. En la Figura 5.31.B. se muestra como los tumores correspondientes al grupo control manifestaron de nuevo un crecimiento continuo, mientras que la presencia de AuNPs alteró esta continuidad acelerando el desarrollo durante los primeros 7 días tras su administración y reduciéndolo ligeramente hasta el punto final. La presencia de LPS a una concentración de 10 μg hizo que los tumores crecieran más lentamente que los del grupo control, aunque finalmente alcanzaron el mismo volumen final de forma prácticamente simultánea. Finalmente, la combinación de AuNPs con LPS mostró el menor crecimiento con respecto al resto de los grupos experimentales, aunque de nuevo pasados 14 días tras el inicio del tratamiento, todos los ratones tuvieron que ser sacrificados por haber alcanzado un volumen de 1 cm^3 .

RESULTADOS

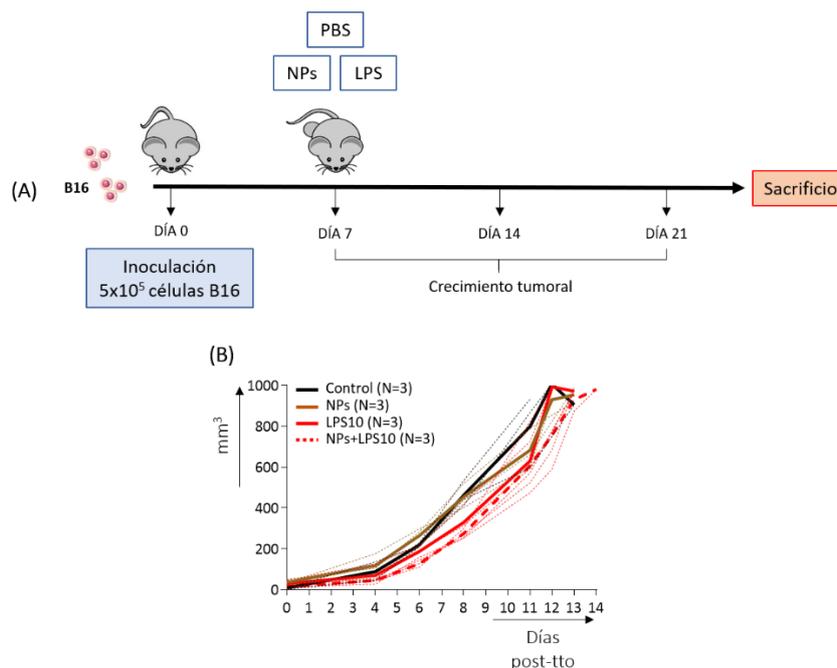


Figura 5.31.- Análisis del efecto de las AuNPs sobre el crecimiento de tumores subcutáneos B16 a largo plazo. (A) Se inocularon 5×10^5 células B16 en el flanco derecho de ratones C57BL/6 WT. Tras 7 días, una vez los tumores comenzaron a crecer, se inyectó intratumoralmente una concentración fija de 2 mg de AuNPs en ausencia o en combinación de 10 μ g de LPS en un volumen final de 100 μ l y se observó el desarrollo tumoral hasta alcanzar el punto final humanitario establecido en un volumen de 1 cm³. La administración de ambos compuestos se hizo de forma independiente, aunque simultánea. Como control se inyectó el mismo volumen de PBS, así como LPS a una concentración final de 10 μ g en ausencia de AuNPs. (B) Se muestran en punteado las curvas de crecimiento a partir del “día 0”, momento en el que se inician los diferentes tratamientos reflejados en el gráfico, para cada uno de los tumores de forma independiente. El volumen se calculó mediante la fórmula $L \cdot A \cdot H$ según se indica en el Apartado 4.8.5. Asimismo, en cada uno de los gráficos, mediante una línea de mayor grosor, se muestran las medias resultado de los diferentes tumores y grupos ensayados. Cada grupo experimental está compuesto por una N=3, tal y cómo se refleja en el gráfico, de un único experimento.

5.3.4. Estudio del efecto de las AuNPs sobre el perfil de expresión de determinados mediadores implicados en inflamación en melanoma murino

B16 *in vivo*

En base a los resultados obtenidos acerca de la variación en el crecimiento de los tumores y las diferencias observadas entre los distintos grupos, con una posible influencia de las AuNPs sobre las mismas, se decidió analizar el perfil de expresión de varias citocinas pro- y antiinflamatorias, así como de algunas quimiocinas. Para ello, se sacrificaron los ratones pasados 7 días tras la administración intratumoral de AuNPs y LPS, de forma que fuimos capaces de realizar el posterior análisis de todos los tumores de forma simultánea, ya que en ninguno de los casos se

había alcanzado el volumen de punto final correspondiente a 1 cm³. A continuación, se llevó a cabo la extracción de los tumores de melanoma B16, y se realizaron los explantes para analizar la expresión de citocinas y quimiocinas *ex vivo*.

Como se muestra en la Figura 5.32., se estudió la expresión de las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α mediante ELISA. Exceptuando a la dosis más baja de LPS (1 μ g), en la que se observó una tendencia a la disminución de la expresión, en el resto de los casos, el aumento de la concentración de LPS (5 y 10 μ g) provocó un incremento de la producción de las citocinas proinflamatorias con respecto al grupo control. Si nos fijamos en las AuNPs, por sí solas también fueron capaces de alterar el patrón de expresión ocasionando un aumento de IL-6 y TNF- α , de manera significativa en este último caso. Al combinarlas con LPS se produjeron variaciones, a las concentraciones de 5 y 10 μ g de LPS con AuNPs se obtuvieron valores más bajos de todas las citocinas en comparación con los obtenidos en ausencia de las mismas. Sin embargo, a la concentración de 1 μ g de LPS con AuNPs, a excepción de IL-1 β en donde se produjo un pequeño incremento, en el resto se mantuvieron los valores constantes en relación a sus respectivos controles.

RESULTADOS

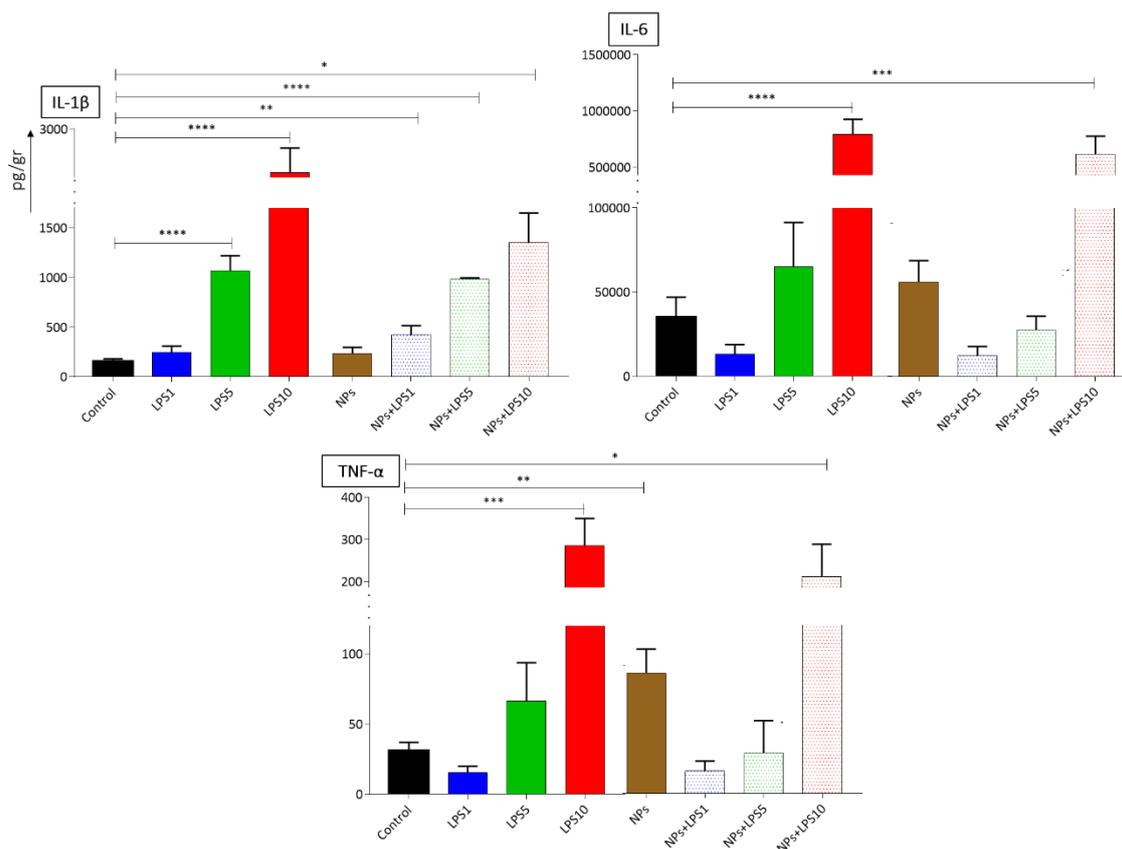


Figura 5.32.- Análisis de la expresión de citocinas proinflamatorias en tumores subcutáneos B16. Tras el sacrificio de los ratones, aquellos tumores que habían sido tratados con LPS a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 μg), AuNPs y con la combinación de ambos, fueron extraídos y pesados, tal y como se describe en el Apartado 4.8.5.1. A continuación, tras realizarles algunos cortes con ayuda de un bisturí estéril se mantuvieron en cultivo durante 24 horas a 37°C en 1 ml de medio RPMI completo en una placa de 24 pocillos. Pasado este tiempo, se recogió el sobrenadante y, tras su centrifugación para la eliminación de restos celulares, se cuantificaron los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α mediante ELISA. Los datos se representan como la media \pm SEM de al menos 4 réplicas biológicas realizadas en al menos 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un t test de Student, donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Asimismo, se analizó la expresión mediante tecnología multiplex de IL-4 e IL-10 (Figura 5.33.), dos de las citocinas antiinflamatorias detectadas con mayor frecuencia. Conforme se aumentó la dosis de LPS administrada, se produjo un incremento de la expresión de ambas citocinas, a excepción de la dosis de 1 μg de LPS, en la que los valores que se obtuvieron fueron menores con respecto al grupo control. El empleo de las AuNPs también generó un aumento de IL-4 e IL-10, aunque en combinación con LPS, dependiendo de la concentración de endotoxina administrada, o bien se observó un ligero descenso de la media resultante producto de la combinación independiente de ambas, como en el caso de las dosis de 1 y 10 μg de LPS, o por el contrario, no se detectó la expresión de ninguna de las dos citocinas analizadas, como en el caso de la dosis de 5 μg de LPS.

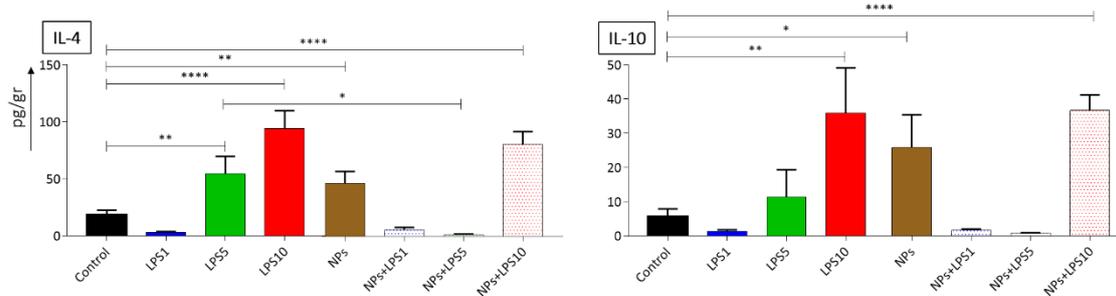


Figura 5.33.- Análisis de la expresión de citocinas antiinflamatorias en tumores subcutáneos B16. Tras el sacrificio de los ratones, aquellos tumores que habían sido tratados con LPS a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 μ g), AuNPs y con la combinación de ambos, fueron extraídos y pesados, tal y como se describe en el Apartado 4.8.5.1. A continuación, tras realizarles algunos cortes con ayuda de un bisturí estéril se mantuvieron en cultivo durante 24 horas a 37°C en 1 ml de medio RPMI completo en una placa de 24 pocillos. Pasado este tiempo, se recogió el sobrenadante y, tras su centrifugación para la eliminación de restos celulares, se cuantificaron los niveles de IL-4 e IL-10 mediante tecnología multiplex. Los datos se representan como la media \pm SEM de al menos 4 réplicas biológicas realizadas en al menos 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un t test de Student, donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Finalmente, se analizó la expresión de las siguientes quimiocinas: CXCL1 o Gro-alpha/KC (del inglés, “Growth-related oncogene/Keratinocyte Chemoattractant”), CXCL2 o MIP-2 alpha (del inglés, “Macrophage Inflammatory Protein-2”), CXCL5 o ENA-78 (del inglés, “Epithelial-Neutrophil Activating protein-78”) y CCL2 o MCP-1 (del inglés, “Monocyte Chemoattractant Protein-1”) ⁴⁹⁷⁻⁵⁰⁰; todas ellas con una alta actividad de atracción de monocitos y PMNs, descritas por su importante implicación en el crecimiento y metástasis de los tumores de melanoma.

En la Figura 5.34.A. se observa que, al igual que ocurría con la producción de las citocinas pro- y antiinflamatorias, la presencia de LPS, de AuNPs y la combinación de ambos componentes, provocó una alteración del perfil de expresión. Por lo general, a concentraciones altas de LPS (dosis de 5 y 10 μ g) se produjo un incremento de la producción, mientras que, a concentración baja (dosis de 1 μ g), los valores de CXCL1 aumentaron significativamente, pero los de CXCL2 y CXCL5 disminuyeron. Las AuNPs mostraron ser capaces de provocar por sí solas un aumento de la expresión de CXCL1 y junto con LPS, de nuevo, en función de la combinación utilizada, se obtuvo diferente patrón de expresión de cada una de ellas.

Por otro lado, al analizar la expresión de CCL2, tal y como se muestra en la Figura 5.34.A., se observaron valores similares en ausencia y presencia de AuNPs.

RESULTADOS

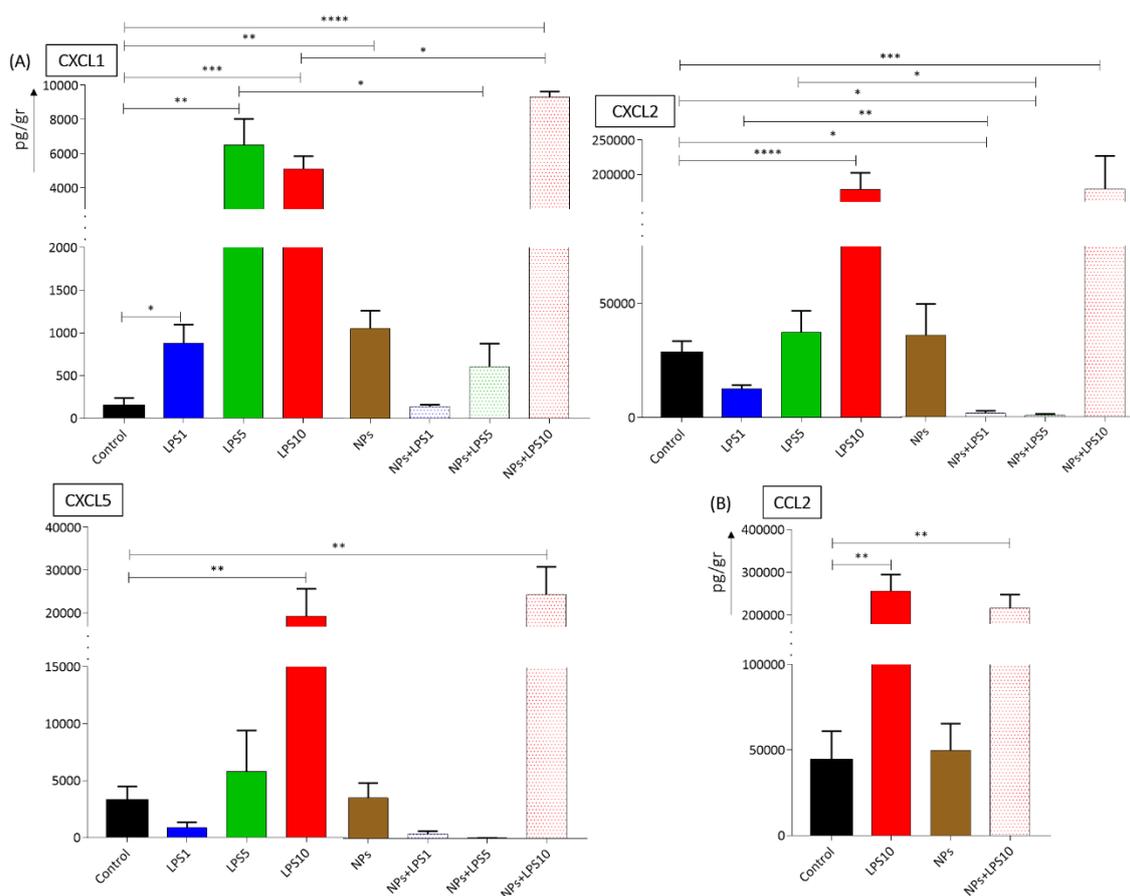


Figura 5.34.- Análisis de la expresión de quimiocinas en tumores subcutáneos B16. Tras el sacrificio de los ratones, aquellos tumores que habían sido tratados con LPS a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 μg), AuNPs y con la combinación de ambos, fueron extraídos y pesados, tal y como se describe en el Apartado 4.8.5.1. A continuación, tras realizarles algunos cortes con ayuda de un bisturí estéril se mantuvieron en cultivo durante 24 horas a 37°C en 1 ml de medio RPMI completo en una placa de 24 pocillos. Pasado este tiempo, se recogió el sobrenadante y, tras su centrifugación para la eliminación de restos celulares, se cuantificaron los niveles de: (A) CXCL1, CXCL2 y CXCL5 y (B) CCL2; todos ellos mediante tecnología multiplex. Los datos se representan como la media \pm SEM de al menos 3 réplicas biológicas realizadas en al menos 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un t test de Student, donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

A partir de los resultados obtenidos durante todo el estudio del efecto de las AuNPs sobre el melanoma murino B16, se seleccionó la concentración de 10 μg de LPS como la más adecuada para estimular el inicio de una respuesta inflamatoria y poder estudiar la influencia de las AuNPs sobre la misma mediante su combinación en experimentos posteriores.

5.3.5. Estudio anatomopatológico del efecto de las AuNPs sobre el melanoma murino B16 *in vivo*

Con el objetivo de evaluar más en detalle el estado de los tumores, se llevó a cabo su estudio histológico basándonos en los criterios de Clark, sistema que se usa para describir la profundidad de la diseminación del tumor a través de las capas de la piel afectadas. Dentro de esta clasificación encontramos cinco niveles: I (intraepidérmico), II (zona de unión), III (dermis papilar), IV (dermis reticular), V (hipodermis); cada uno de ellos asociado a un grado de supervivencia.

La evaluación de las muestras fue llevada a cabo por el Dr. José Antonio Uranga Ocio, del Área de Histología de la Universidad Rey Juan Carlos. Todos los tumores estudiados presentaron una masa tumoral compatible con el nivel 5 según los criterios anteriormente descritos, siendo la máxima profundidad de invasión que puede presentar un melanoma. Como se observa en la Figura 5.35., por un lado, los tumores del grupo control y los tumores tratados con LPS no mostraron diferencias significativas en cuanto a la tinción HE. Por otro lado, los tumores tratados con AuNPs mostraron depósitos localizados de oro en células fagocitarias como los MØ, especialmente en la zona peritumoral, mientras que en aquellos tratados con la combinación de AuNPs y LPS, la infiltración de estas células llegó a alcanzar la zona central incluso la lámina propia.

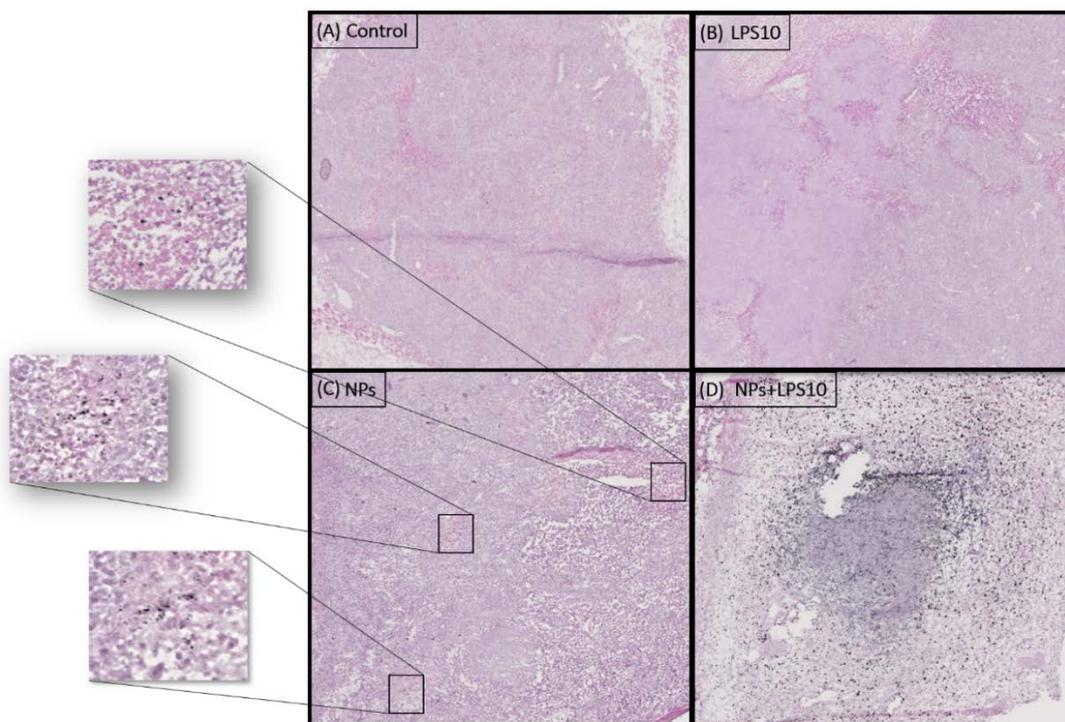


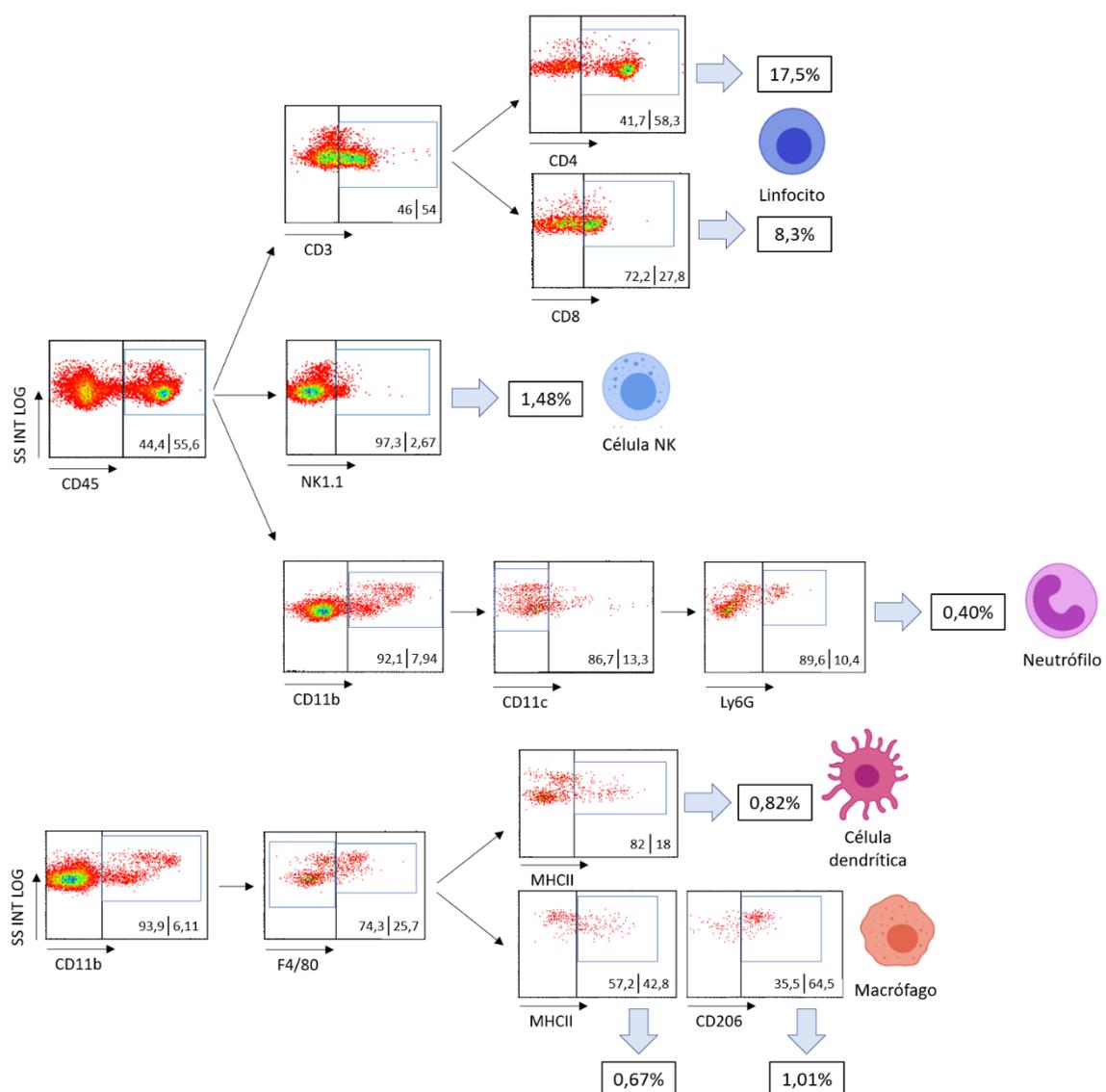
Figura 5.35.- Estudio de anatomía patológica de tumores subcutáneos B16 tratados con AuNPs. Se inocularon 5×10^5 células B16 en el flanco derecho de ratones C57BL/6 WT. Tras 7 días, una vez los tumores comenzaron a crecer, se inyectó intratumoralmente una concentración fija de 2 mg de AuNPs en ausencia o en combinación con una concentración de 10 μg de LPS en un volumen final de 100 μl . La administración de ambos compuestos se hizo de forma independiente, aunque simultánea. Como control se inyectó el mismo volumen de PBS. Pasados otros 7 días tras el tratamiento, los ratones fueron sacrificados y los tumores extraídos para ser fijados en PFA 4% durante 24 horas a 4°C y posteriormente preservados en etanol al 70% hasta su inclusión en parafina en el Servicio de Anatomía Patológica del CIBA. Tras la obtención de algunas secciones, se utilizó el digitalizador de portaobjetos de microscopio Axio Scan. Z1 (Zeiss) para la obtención de las imágenes. Se muestra un ratón de modo representativo, de cada uno de los siguientes grupos experimentales: (A) Control; (B) LPS10; (C) NPs; (D) NPs+LPS10.

5.3.6. Estudio del efecto de las AuNPs sobre las poblaciones inmunológicas presentes en el microentorno tumoral del melanoma murino B16 *in vivo*

Con el objetivo de completar el análisis del efecto de las AuNPs, se planteó llevar a cabo el estudio de las células inmunitarias infiltrantes que conforman el TME: linfocitos T de carácter antitumoral o inmunoregulador, células NK, DCs, $M\phi$ asociados a tumor (TAMs; del inglés, “Tumor Associated Macrophages”) o neutrófilos son algunas de ellas^{501,502}.

En primer lugar, una vez diseñados los paneles de citometría apropiados para la distinción de los principales tipos de células inmunes (Anexo II), se utilizó la suspensión celular obtenida tras la disgregación de un bazo procedente de un ratón C57BL/6 WT para optimizar el marcaje de

cada una de estas poblaciones. Se fijaron las condiciones óptimas de adquisición empleando como control la fluorescencia menos uno (FMO; del inglés, "Fluorescence Minus One") para establecer los parámetros necesarios para la compensación del efecto de solapamiento de los espectros de emisión de los diferentes fluorocromos utilizados. Tal y como se observa en la Figura 5.36., los porcentajes finalmente obtenidos de células linfoides y células mieloides fueron acordes a lo descrito en la bibliografía (<https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-cell-frequency.html#%E2%80%8BMurine>), corroborando de esta forma que los paneles establecidos eran los adecuados.



RESULTADOS

Figura 5.36.- Esquema representativo del análisis de las poblaciones inmunológicas en bazo. Tras el sacrificio de los ratones, se procedió a la extracción y disgregación del bazo, tal y como se describe en el Apartado 4.8.1. A continuación, se procedió a la determinación de las células inmunes mediante el análisis de la expresión de los marcadores extracelulares CD45, CD3, CD4, CD8, NK1.1., CD11b, CD11c, Ly6G, F4/80, MHCII y CD206. Se muestra un experimento representativo del análisis realizado mediante citometría de flujo en el que se representan los porcentajes de células para cada uno de los marcadores. Los números en la esquina inferior muestran el porcentaje de células correspondientes a cada cuadrante.

A continuación, se realizó el mismo tipo de análisis de las células inmunes infiltrantes, en este caso extraídas a partir de las suspensiones celulares obtenidas tras la disgregación de los tumores B16, tal y como se detalla en el Apartado 4.8.5.2. En todos los experimentos realizados se efectuó la exclusión de dobletes y otros agregados celulares, y se descartaron las células muertas mediante el marcaje con 7-AAD (Figura 5.37.A.). Además, debido a que el número de células inmunes representa un porcentaje minoritario frente al porcentaje de células tumorales, se realizó una primera selección con respecto a CD45 para las células de estirpe linfoide y con respecto a CD11b para las células de estirpe mieloide, haciendo siempre referencia a este primer marcaje para la expresión del porcentaje final de cada una de las poblaciones celulares, tal y como se observa en la Figura 5.37.B.

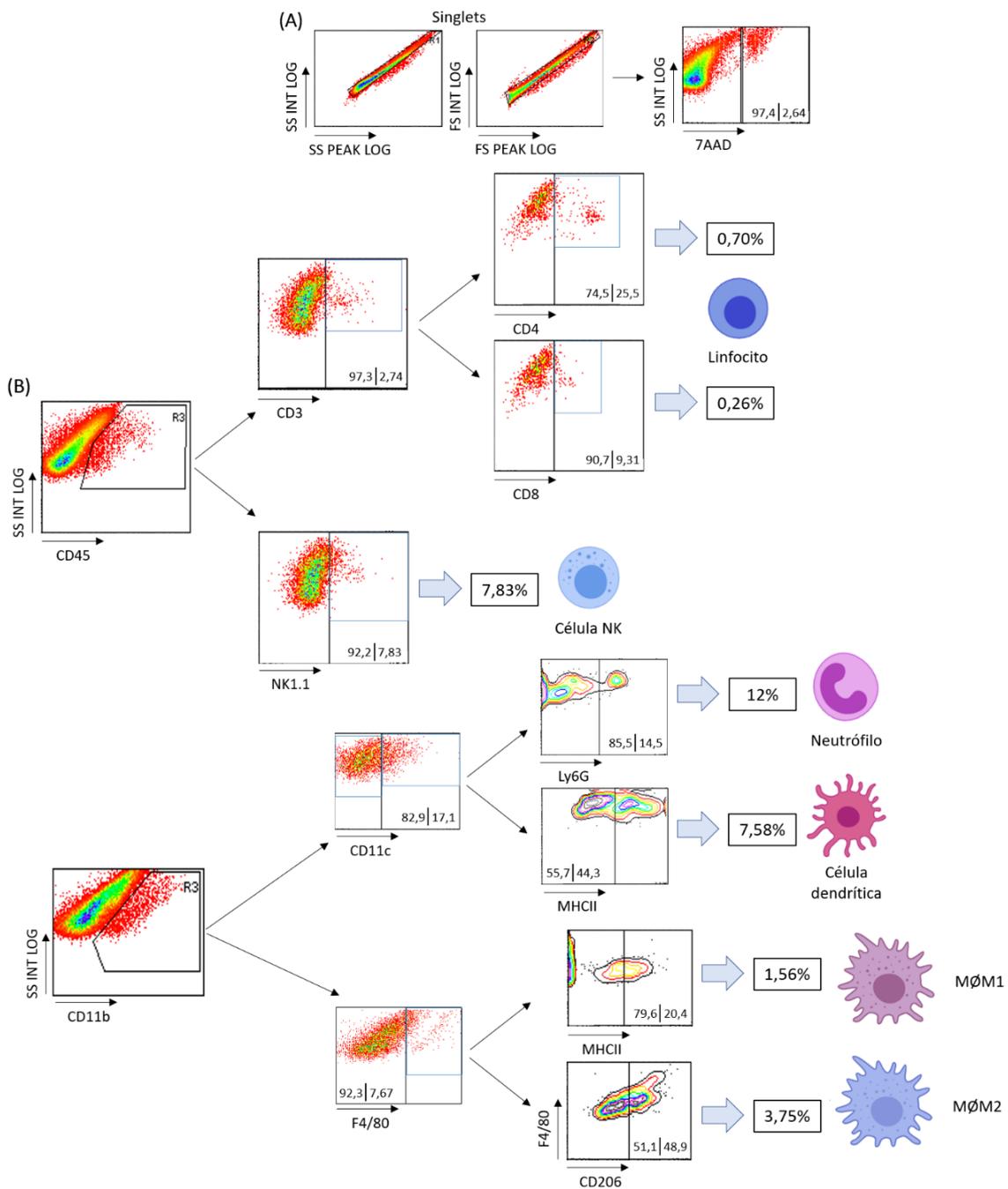


Figura 5.37.- Esquema representativo del análisis de las poblaciones inmunológicas en tumores subcutáneos B16. Tras el sacrificio de los ratones, aquellos tumores que habían sido tratados con una concentración de 10 µg de LPS, AuNPs o con la combinación de ambos, fueron extraídos y disgregados, tal y como se describe en el Apartado 4.8.5.2. A continuación, se procedió a la determinación de las células inmunes infiltrantes mediante el análisis de la expresión de los marcadores extracelulares CD45, CD3, CD4, CD8, NK1.1., CD11b, CD11c, Ly6G, F4/80, MHCII y CD206. Se muestra un experimento representativo del análisis realizado mediante citometría de flujo en el que se representa (A) la selección de los *singlets* y la exclusión de las células muertas mediante el marcaje con 7-AAD y (B) los porcentajes de células para cada uno de los marcadores. Los números en la esquina inferior muestran el porcentaje de células correspondientes a cada cuadrante.

RESULTADOS

Siguiendo con el protocolo establecido, se analizaron los distintos grupos experimentales tal y como se muestra en la Figura 5.38.A. Los resultados mostraron como la administración de LPS a una dosis de 10 μg duplicó el número de linfocitos T CD8^+ y provocó un ligero incremento de los neutrófilos con respecto al grupo control. Por otro lado, las AuNPs alteraron casi la totalidad de las poblaciones analizadas, mostrando en todos los casos incrementos o descensos con respecto al grupo control, aunque de manera menos drástica que el LPS. Mientras, en combinación, fueron capaces de duplicar tanto el número de linfocitos T CD4^+ como de linfocitos T CD8^+ . Asimismo, también se analizaron las diferentes subpoblaciones de $\text{M}\emptyset$ que podemos encontrar en el TME (Figura 5.38.B.). Se observó, como era de esperar, que la administración de LPS indujera una polarización de los $\text{M}\emptyset\text{M1}^{503}$, mientras que las AuNPs o la combinación de ambos promovían la polarización hacia un fenotipo M2 , resultados que fueron respaldados al mostrar un incremento en la expresión de $\text{PD-L1}^{504,505}$, tal y como se muestra en la Figura 5.38.C.

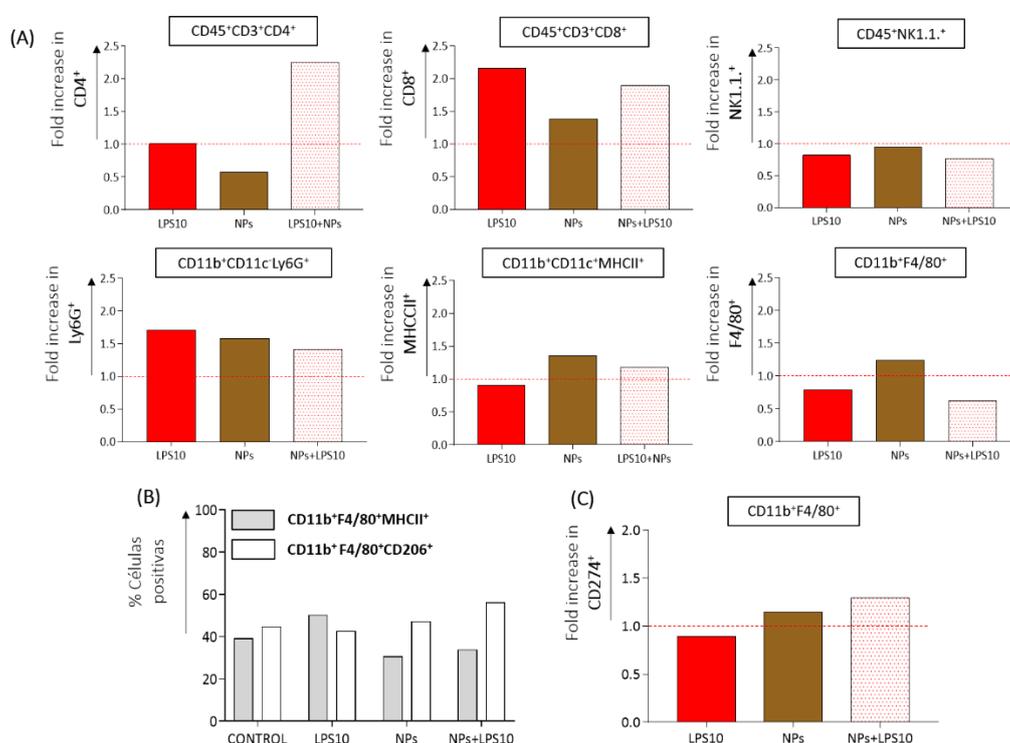


Figura 5.38.- Análisis de las poblaciones inmunológicas en tumores subcutáneos B16. Tras el sacrificio de los ratones, aquellos tumores que habían sido tratados con una concentración de 10 μg de LPS, AuNPs y con la combinación de ambos, fueron extraídos y disgregados, tal y como se describe en el Apartado 4.8.5.2., y a continuación, se procedió a la determinación de las células inmunes infiltrantes mediante el análisis de la expresión de los marcadores extracelulares CD45 , CD3 , CD4 , CD8 , NK1.1 , CD11b , CD11c , Ly6G , F4/80 , MHCII , CD206 y CD274 . (A) Se muestra únicamente la media de la expresión de cada uno de los marcadores analizados de los diferentes grupos ensayados con respecto al grupo control. (B) Se muestra la media del porcentaje de células positivas para los $\text{M}\emptyset\text{M1}$ y $\text{M}\emptyset\text{M2}$ de cada uno de los diferentes grupos experimentales. (C) Se muestra la media de la expresión de CD274 de los diferentes grupos ensayados con respecto al grupo control. Cada grupo experimental está compuesto por diferente número de ratones, de un mínimo de 3 experimentos independientes.

5.3.7. Estudio de la influencia de las AuNPs en el tratamiento con anti-PD-1 del melanoma murino B16 *in vivo*

La dualidad de la inflamación ha generado que el uso de compuestos inmunosupresores o agentes bloqueantes de citocinas proinflamatorias para tratar la inflamación crónica pueda provocar la aparición de graves efectos secundarios como una mayor disposición a padecer infecciones o al desarrollo del cáncer. Por lo que en base a los resultados obtenidos *in vivo*, los cuales sugerían que las AuNPs podrían modular el TME, se planteó la posibilidad de evaluar un posible efecto sinérgico entre las AuNPs y el tratamiento con anti-PD-1, un agente inmunoterapéutico frecuentemente empleado en clínica para el tratamiento de diferentes tipos de tumor como el melanoma metastásico⁵⁰⁶.

Para ello, se inocularon por vía s.c. células B16 en ratones WT y, una vez los tumores comenzaron a desarrollarse de forma visible/palpable, se inyectaron intratumoralmente 2 mg de AuNPs, tal y cómo se muestra en la Figura 5.39.A. Una vez inyectadas las AuNPs a “día 0”, los ratones comenzaron a ser tratados con dos concentraciones diferentes de anti-PD-1, administradas por vía i.p. cada 2 días hasta alcanzar un total de 3 administraciones. Durante todo este tiempo, se realizó el seguimiento del crecimiento tumoral (Figura 5.39.B.). A concentraciones bajas de anti-PD-1 no se observaron cambios independientemente de la ausencia o presencia de las AuNPs, mientras que a dosis más altas sí que pudimos ver como la combinación de ambos componentes provocó un retardo en el crecimiento con relación a su respectivo control de AuNPs sin combinar. Sin embargo, este efecto no resultó ser significativo debido a la variabilidad entre los diferentes tumores del mismo grupo experimental.

Además del seguimiento del desarrollo tumoral, a lo largo de todo el procedimiento experimental se controló el estado de los ratones mediante su peso, apariencia y nivel de actividad. De esta forma, se evidenció que el LPS no mostraba toxicidad a las dosis administradas ya que no se observaron cambios con respecto al grupo control.

RESULTADOS

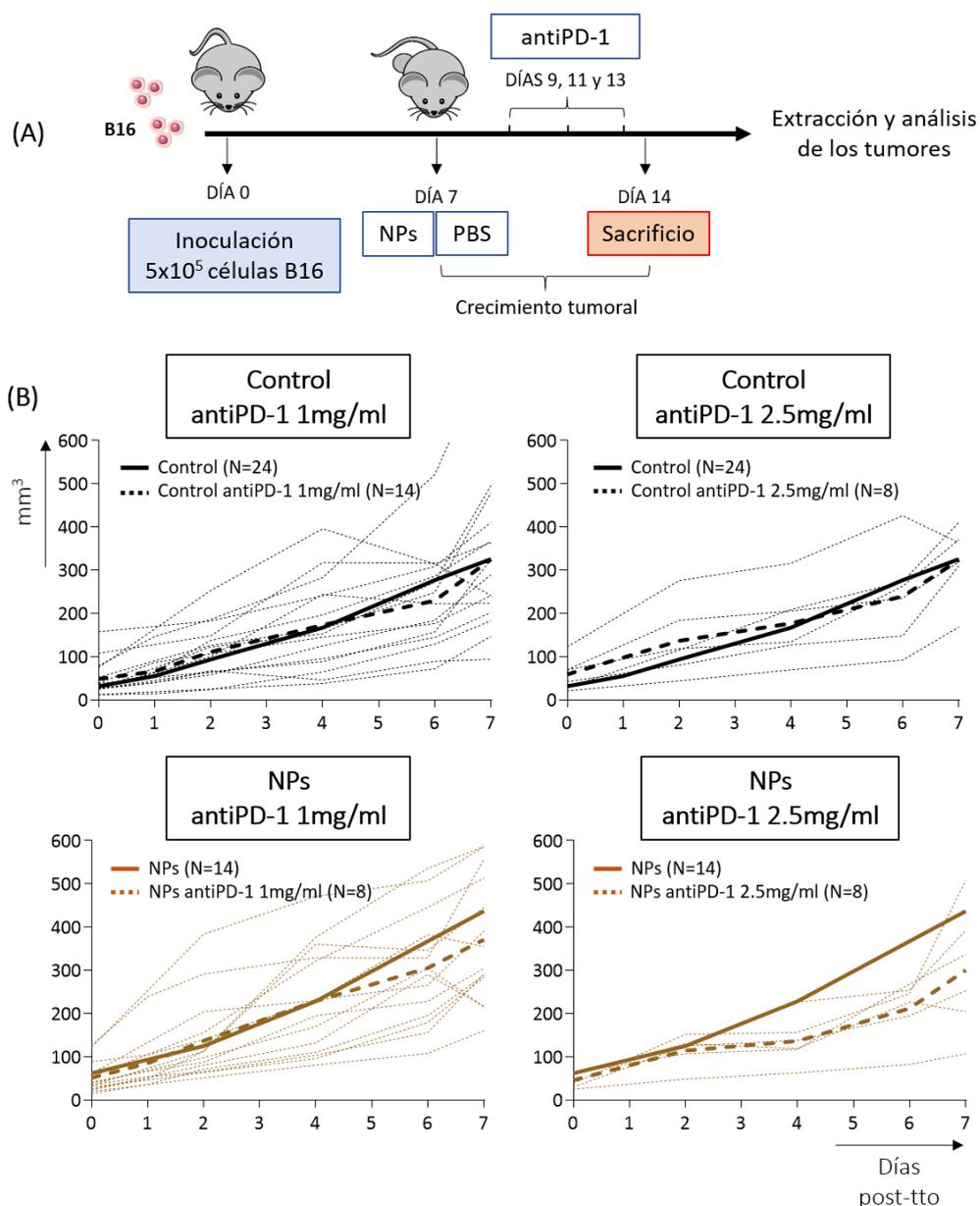


Figura 5.39.- Análisis del efecto de las AuNPs sobre tumores subcutáneos B16 tratados con anti-PD-1. (A) Se inocularon 5×10^5 células B16 en el flanco derecho de ratones C57BL/6 WT. Tras 7 días, una vez los tumores comienzan a crecer, se inyectó intratumoralmente una concentración fija de 2 mg de AuNPs en un volumen final de 100 μ l. Durante los días 9, 11 y 13 tras el inicio del experimento, se administró vía i.p. el tratamiento con anti-PD-1 (1 y 2,5 mg/ml) y se observó el desarrollo tumoral hasta alcanzar el día 14. Como control se inyectó el mismo volumen de PBS y las distintas dosis de anti-PD-1. (B) Se muestran en punteado las curvas de crecimiento a partir del día 0, momento en el que se inicia el tratamiento con las AuNPs, para cada uno de los tumores de forma independiente. El volumen se calculó mediante la fórmula $L \cdot A \cdot H$ según se indica en el Apartado 4.8.5. Asimismo, en cada uno de los gráficos, mediante una línea discontinua de mayor grosor se muestra la media, resultado de los diferentes tumores, y mediante una línea continua se muestra la media de su respectivo grupo control. Se consideró como punto final el momento en el que los tumores podían llegar a alcanzar un volumen de 0.5 cm^3 , el cual se aproximó al día 7 tras la inyección intratumoral de AuNPs. Cada grupo experimental está compuesto por diferente número de ratones, tal y como se refleja en el gráfico, de un mínimo de 2 experimentos independientes.

A continuación, como se muestra en la Figura 5.40.A., se analizó la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α mediante ELISA. El tratamiento con una dosis de 1 mg/ml de anti-PD-1, dio como resultado un incremento de la producción de IL-1 β y TNF- α , mientras que, los niveles de IL-6 permanecieron estables en comparación con el grupo control. Por el contrario, en presencia de AuNPs a esta misma dosis de anti-PD-1, no se observaron aumentos con relación a su respectivo grupo control de AuNPs sin tratar, incluso en el caso de la IL-6 se manifestó un descenso en el nivel de expresión. El tratamiento con una dosis de 2,5 mg/ml de anti-PD-1 en ausencia de AuNPs no mostró variaciones relevantes con respecto al grupo control. Sin embargo, las AuNPs a esta dosis de tratamiento produjeron mayores descensos de la producción de IL-1 β e IL-6, aunque únicamente resulto ser significativo en este último caso. De nuevo, los niveles de TNF- α permanecieron sin alterarse en presencia de anti-PD-1 y AuNPs.

Asimismo, se analizó la expresión de las citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10 mediante tecnología multiplex, tal y como se muestra en la Figura 5.40.B. Se observó que la administración de anti-PD-1 estimuló la reducción de la expresión de ambas citocinas independientemente de la ausencia o presencia de las AuNPs en el entorno, y, además, podríamos decir, que el descenso fue proporcional a la dosis administrada del agente inmunoterapéutico.

RESULTADOS

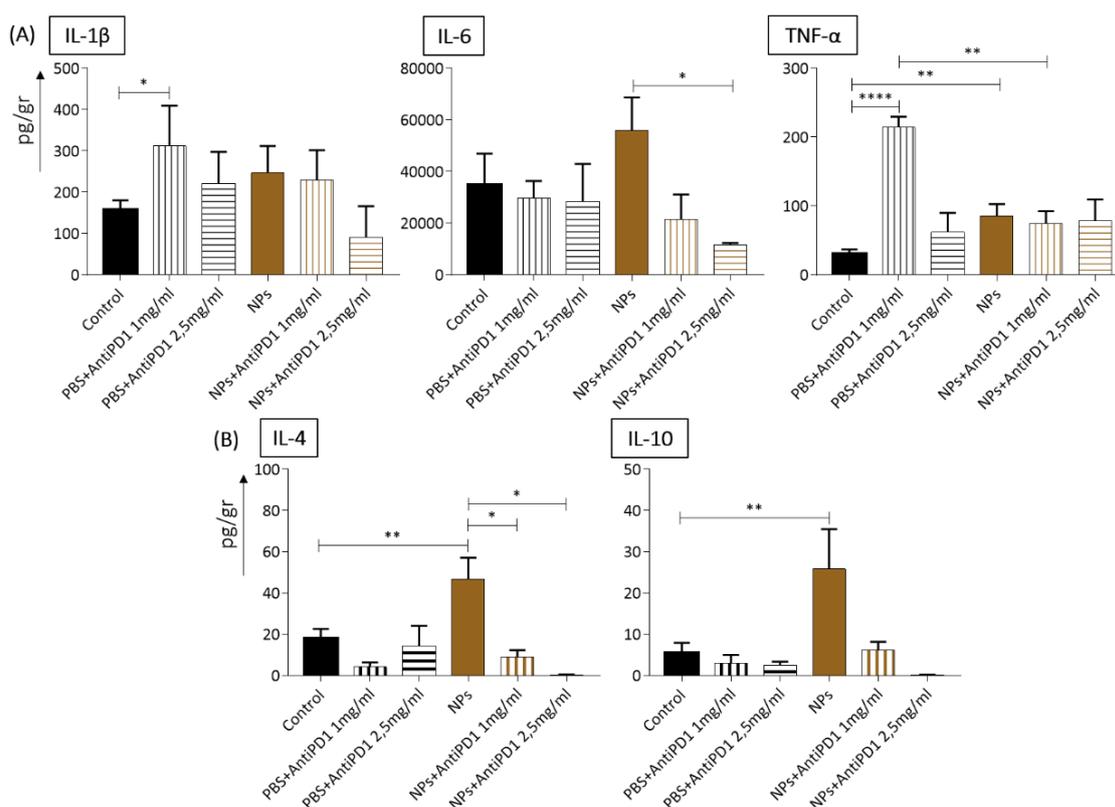


Figura 5.40.- Análisis de la expresión de citocinas pro- y antiinflamatorias de tumores subcutáneos B16 tratados con anti-PD-1. Tras el sacrificio de los ratones, los tumores tratados con AuNPs y anti-PD-1 fueron extraídos y pesados, tal y como se describe en el Apartado 4.8.5.1., y a continuación, tras realizarles algunos cortes con ayuda de un bisturí estéril se mantuvieron en cultivo durante 24 horas a 37°C en 1 ml de medio RPMI completo en una placa de 24 pocillos. Pasado este tiempo, se recogió el sobrenadante y, tras su centrifugación para la eliminación de restos celulares, se cuantificaron los niveles de: (A) IL-1 β , IL-6 y TNF- α mediante ELISA y (B) IL-4 e IL-10 mediante tecnología multiplex. Los datos se representan como la media \pm SEM de al menos 4 réplicas biológicas realizadas en al menos 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un t test de Student, donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Finalmente, tras el tratamiento con 1 mg/ml de anti-PD-1, el resultado de la expresión de las quimiocinas analizadas (Figuras 5.41.A. y 5.41.B.) señaló una disminución de los niveles independientemente del grupo experimental para CXCL2 y CCL2, aunque para CXCL5 solamente pudimos observarlo en presencia de AuNPs, ya que en ausencia de las mismas los valores se mantuvieron estables. A dosis de 2,5 mg/ml de anti-PD-1, también advertimos variaciones en función de las condiciones establecidas, destacando el incremento de CCL2 producido por la presencia de AuNPs a dosis alta de anti-PD-1.

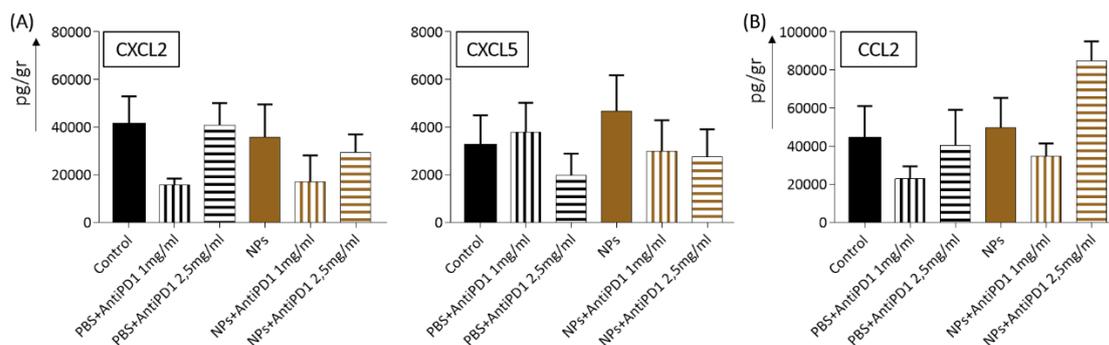


Figura 5.41.- Análisis de la expresión de quimiocinas de tumores subcutáneos B16 tratados con anti-PD-1. Tras el sacrificio de los ratones, los tumores tratados con AuNPs y anti-PD-1 fueron extraídos y pesados, tal y como se describe en el Apartado 4.8.5.1., y a continuación, tras realizarles algunos cortes con ayuda de un bisturí estéril se mantuvieron en cultivo durante 24 horas a 37°C en 1 ml de medio RPMI completo en una placa de 24 pocillos. Pasado este tiempo, se recogió el sobrenadante y, tras su centrifugación para la eliminación de restos celulares, se cuantificaron los niveles de: (A) CXCL2 y CXCL5 (B) CCL2; todos ellos mediante tecnología multiplex. Los datos se representan como la media \pm SEM de al menos 4 réplicas biológicas realizadas en al menos 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un t test de Student, donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.3.8. Discusión

El gran desarrollo de la nanotecnología ha abierto un debate importante sobre la seguridad de los nanomateriales y su impacto medioambiental. Hoy en día, ya son numerosos trabajos los que estudian la toxicidad de los diferentes tipos de NPs que se utilizan en los diversos campos, especialmente en el ámbito de la biomedicina. Sin embargo, uno de los principales problemas es la discrepancia con las condiciones experimentales en las que se evalúan los efectos de toxicidad y biodistribución⁵⁰⁷, ya que es posible que las NPs no sean tóxicas para la célula en la que se encuentran en cuanto a que no produzcan su muerte, pero pueden alterar su funcionamiento^{419,508,509}. Asimismo, comprender sus interacciones con el sistema inmunológico resulta esencial para la optimización de estos sistemas. Por todo ello, se estableció como objetivo para este trabajo de tesis, llevar a cabo un estudio más exhaustivo del efecto de las AuNPs mediante la realización de ensayos de inmunotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*.

El LPS es considerado como un factor de virulencia y potente inmunoestimulador, componente mayoritario de la pared celular de las bacterias Gram negativas¹⁰⁰. Dependiendo de la intensidad de respuesta, el LPS vía TLR4, es capaz de desencadenar la liberación de numerosas citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) mediante la activación de NF- κ B⁵¹⁰. Los primeros resultados obtenidos, señalaron que la expresión de las diferentes citocinas no sólo depende de la dosis de LPS administrada, sino que el tiempo de incubación también resulta determinante para la activación de los M \emptyset .

RESULTADOS

Aunque el oro se define como inerte y biocompatible, las propiedades fisicoquímicas de las AuNPs, como son la superficie, la forma o el tamaño, juegan un papel relevante en sus efectos sobre las células inmunes⁵¹¹, tal y como se describía en el Apartado 2.4.2., especialmente en las células fagocíticas como son los MØ o las DCs, dado que son las primeras en detectar agentes extraños. Por este motivo resulta esencial caracterizar la inmunotoxicidad de las AuNPs determinando si son capaces de activar el sistema inmune⁵¹². Tras el análisis *in vitro* de la expresión de citocinas proinflamatorias en MØM1, se mostró como las propiedades de la superficie de las nanoesferas de oro de 14 nm empleadas, pueden conducir a una mayor o menor activación de la respuesta inflamatoria, tal y cómo se había descrito en estudios previos^{513,514}, sin manifestar citotoxicidad. Asimismo, nuestros resultados demostraron como las AuNPs seleccionadas, con un tamaño de 14 nm recubiertas con PEG-N₃ y PEG-COOH con el 100% de la superficie saturada, son capaces de perturbar la respuesta inflamatoria provocada por la administración de diferentes dosis de LPS, alterando los niveles de expresión de las citocinas IL-1β, IL-6 y TNF-α en MØM1 y de IL-6 y TNF-α en MØM2.

Para explicar estas alteraciones, por un lado, se ha descrito como propiedad inherente del oro la de unirse a los grupos tioles⁵¹⁵, por lo que la presencia de residuos de cisteína en el complejo IKK lo convierte en un objetivo probable al cual pueden unirse las AuNPs. Se ha demostrado que las AuNPs pueden penetrar la membrana de linfocitos B e interactuar con los componentes de la vía de señalización NF-κB, alterando la función normal de las células⁵¹⁶. Otros estudios previos revelaron que el oro es capaz de inhibir la actividad IKK sobreexpresada en células COS⁵¹⁶, y como este efecto inhibitorio está asociado con la supresión de la degradación de las proteínas IκB⁵¹⁶, inhibiendo la producción de IL-1β y TNF-α en MØ estimulados con LPS⁵¹⁷. Asimismo, se ha señalado que las AuNPs pueden suprimir la producción de NO inducida por endotoxinas mediante la inhibición de las vías NF-κB e IFN-β/STAT1⁵¹⁸, resultando en una disminución de la inflamación y el daño oxidativo⁵¹⁹, y por lo tanto mostrando propiedades antiinflamatorias⁵²⁰. Sin embargo, al contrario, otros estudios muestran como las AuNPs incrementan la producción de NO e IL-6 inducida por el LPS, mediante la activación de p38 MAPK y NF-κB⁵²¹, y de otros mediadores inflamatorios por lo que se les atribuyen propiedades proinflamatorias^{522,523}.

Por otro lado, es bien sabido que las NPs absorben multitud de moléculas localizadas en el entorno circulante para reducir su energía libre, debido a su naturaleza altamente reactiva. Cabe destacar que, algunos estudios han señalado que el LPS no se adhiere a las NPs PEGiladas,

debido a que la interacción con estas moléculas depende de las propiedades fisicoquímicas de las NPs, especialmente de su superficie⁵²⁴. En caso de que esto sucediera, se ha descrito como la funcionalización de las NPs con LPS provoca una alteración en la estructura de la endotoxina, de manera que le permite mantener su capacidad de inducir una respuesta inflamatoria pero elimina sus efectos de resolución de la misma, siendo incapaz de producir mediadores antiinflamatorios⁵²⁵⁻⁵²⁷.

Sin embargo, las alteraciones que se obtuvieron en relación con el estudio de las citocinas proinflamatorias en MØ no seguían un patrón de incremento o descenso con relación a sus respectivos controles, por lo que en este caso no podemos afirmar que las AuNPs seleccionadas posean propiedades pro- o antiinflamatorias, ni tampoco que se acomplejen con el LPS, de tal forma que, al disminuir la concentración de endotoxina libre en el medio, se produciría una reducción de la respuesta inflamatoria. No obstante, podemos concluir que las AuNPs provocan una desregulación en las vías de expresión de las citocinas proinflamatorias, y que el aumento o la disminución de alguna de ellas, podría influir en la producción del resto⁵²⁸.

Como ya se describía en el Apartado 1.2.1., la inflamación puede ser considerada como un arma de doble filo, ya que puede ser un proceso beneficioso para el organismo o, por el contrario, presentar un carácter patofisiológico asociado a muchas enfermedades como el cáncer. Nuestros resultados sobre el crecimiento de los tumores tras el tratamiento con LPS, podrían explicarse en base a esta teoría, sugiriendo que la dosis empleada de endotoxina podría estar generando diferente tipo de inflamación. Mientras que a una dosis de 5 µg de LPS se producía una remisión completa en la mayoría de los tumores, a la concentración de 10 µg de LPS, los tumores mostraban un desarrollo continuo durante todo el experimento, sin demostrar toxicidad en ninguno de los casos.

Entre las principales aplicaciones de las AuNPs dentro del campo de la biomedicina, encontramos el diagnóstico y la terapia de enfermedades neoplásicas. Su uso se centra principalmente en mejorar el balance entre la eficacia terapéutica y la toxicidad sistémica que producen algunos agentes quimioterápicos convencionales. También en la optimización del tiempo de vida media y la biodisponibilidad de los diferentes fármacos empleados para reducir sus efectos secundarios⁵²⁹. Debido a la elevada permeabilidad vascular que presentan ciertos tumores sólidos, las AuNPs tienen la capacidad de acumularse en ellos. Esta propiedad, ampliamente descrita, se conoce con el nombre de efecto mejorado de permeabilidad y retención (EPR; del inglés, "Enhanced Permeability and Retention effect"), y se debe a que la

RESULTADOS

aparición de un tumor sólido induce la rápida formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) caracterizados por un endotelio poco cohesionado y muy fenestrado, lo que, sumado a la liberación de factores de permeabilidad vascular, permite la extravasación de las NPs. Además, las áreas tumorales se caracterizan por la ausencia de drenaje linfático funcional, lo que limita la eliminación de las NPs extravasadas, prolongando su tiempo de permanencia en el tejido neoplásico, lo que garantiza la efectividad de las nuevas terapias con NPs, así como mejora la eficacia de los tratamientos⁵³⁰. Por consiguiente, se analizaron las AuNPs testadas *in vitro* en un contexto de inflamación durante el cual se sabe que aumenta la permeabilidad vascular y el sistema inmune permanece activo^{531,532}. Nuestros resultados demuestran que la presencia de las AuNPs en el TME provoca alternaciones, dando lugar a incrementos en la expresión de mediadores tanto proinflamatorios como antiinflamatorios. Asimismo, las AuNPs en combinación con dosis bajas de LPS podrían estar actuando como segunda señal en el modelo propuesto de dos señales para la activación eficiente del inflamasoma NLRP3, tal y como se describía en el Apartado 1.2.2.2. Esto promueve un incremento en el crecimiento de los tumores, así como una mayor expresión de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, por el contrario, las AuNPs en combinación con dosis altas de LPS mostraron propiedades antiinflamatorias mediante un retraso del crecimiento tumoral, un descenso de la producción de las citocinas proinflamatorias y un incremento de la expresión de algunas de las quimiocinas analizadas. Esto podría ser debido a una mayor infiltración de las NPs administradas a lo largo de toda la masa tumoral, como se pudo apreciar en las imágenes obtenidas mediante el estudio anatomopatológico.

La inmunoterapia es una estrategia terapéutica que aprovecha el sistema inmune para conseguir una respuesta contra el tumor. En cuanto a su mecanismo de acción, puede estar enfocada a modular o a restaurar el sistema inmune⁵³³. En el caso de la inmunoterapia específica, la estrategia se basa en la inducción de una respuesta frente a antígenos concretos del tumor, que se presentan de manera inmunogénica. La terapia de DCs forma parte de ella y aprovecha la capacidad de presentación antigénica de estas células, así como su efecto inmunomodulador⁵³⁴. En la actualidad, existen numerosos estudios acerca del gran potencial de las AuNPs en el desarrollo de inmunoterapias y su éxito está basado en el control preciso de sus propiedades fisicoquímicas. El tamaño y la forma pueden influir en la capacidad de las AuNPs para alcanzar las células diana o para interactuar con ellas. Estas pueden atravesar la membrana celular de forma pasiva a través de la difusión y otros mecanismos de internalización (Fernández et al., 2015, Oh et al., 2011), así como facilitar el contacto con otras células involucradas en la respuesta inmunológica. Se ha demostrado que determinadas NPs son capaces de inducir cambios

morfológicos sobre las DCs, así como modular la expresión de algunos de sus receptores de superficie, como es el caso de la molécula MHCII^{408,511,535}. Nuestros estudios demostraron que, las AuNPs empleadas no eran capaces de modular la maduración de las BMDCs *in vitro*, sin embargo, disminuyeron la expresión de CD40, CD80, CD86 y MHCII inducida por la adición de LPS. Tanto para el porcentaje de células positivas como para los niveles de expresión de cada uno de los marcadores analizados. Esta inhibición de la maduración podría ser debida a la modulación de la señalización celular, tal y cómo se describe en algunos estudios previos^{408,536}.

Otro de los tratamientos empleados en inmunoterapia es el uso de anticuerpos bloqueantes, tal y como se describía en el Apartado 1.1.3.1., los cuales actúan a nivel del TME, impidiendo la interacción con el tumor y las células estromales. El TME está constituido por una gran variedad de células inmunes infiltrantes, entre las cuales los TAMs juegan un papel clave. Su incremento se ha correlacionado con un mal pronóstico⁵³⁷ debido a la secreción de diversos factores de crecimiento, los cuales pueden aumentar la formación de vasos sanguíneos⁵³⁸, o de enzimas que degradan la matriz extracelular facilitando que el tumor pueda invadir los tejidos adyacentes⁵³⁹. Mas concretamente, una mayor infiltración de MØM2 se asocia con una mayor invasión, progresión y metástasis del tumor⁵⁴⁰. Nuestros resultados mostraron que las AuNPs estudiadas, además de ser capaces de alterar las distintas poblaciones celulares que conforman el TME, provocan una polarización de los TAMs hacia un fenotipo M2.

A pesar de que actualmente los tratamientos con ICIs son considerados como “la revolución terapéutica”, su efectividad depende de la existencia de un TME inmunogénico. En la actualidad, solo unos pocos tumores poseen esta característica, denominados como “tumores calientes”, mostrando altas tasas de respuesta y, por lo tanto, mejores tasas de supervivencia en los pacientes⁵⁴¹. Por el contrario, se estima que el 85% de los tumores restantes son los considerados como “tumores fríos”, aquellos en los que las células inmunes han sido incapaces de penetrar, por lo que presentan bajos niveles de infiltración⁵⁴². Por ello, multitud de ensayos buscan “convertir tumores fríos en tumores calientes” a través de los efectos potencialmente sinérgicos de las diferentes combinaciones existentes, ya sea con diferentes tipos de inmunoterapia o con tratamientos convencionales. El modelo de melanoma murino B16 utilizado para llevar a cabo los estudios *in vivo*, es considerado como un tumor frío, ya que apenas produce respuesta frente al tratamiento con anti-PD-1 como puede verse en las gráficas de crecimiento tumoral, algo que ya había sido descrito previamente^{543,544} (<https://es.covance.com/industry-solutions/oncology/preclinical/tumor-spotlights/b16-f10-a-murine-melanoma-model.html>). Sin

RESULTADOS

embargo, tras analizar el crecimiento de los tumores tratados con anti-PD-1 en combinación con AuNPs, nuestros resultados mostraron una mayor sensibilidad de los tumores B16 al tratamiento administrado, lo cual podría explicarse gracias al aumento de los TAMs con fenotipo M2, los cuales presentan una mayor expresión de la proteína PD-1 en su superficie ⁵⁴⁵.

Finalmente, diversos estudios han señalado que el TNF- α es capaz de desempeñar un doble papel en oncoimmunología, actuando como factor antitumoral ⁵⁴⁶ o como citocina inmunosupresora ^{547,548}, aumentando la expresión de PD-L1 en las células tumorales o la eliminación de linfocitos T activados. Asimismo, se ha asociado un incremento en la expresión de TNF- α en muestras de pacientes de melanoma metastásico tratados con anti-PD-1 ⁵⁴⁹. El análisis de la expresión de citocinas y quimiocinas apoyó lo anteriormente descrito ⁵⁵⁰ y sugiriendo que las AuNPs son capaces de mejorar el tratamiento de melanoma murino con anti-PD-1.

CONCLUSIONES

Capítulo 6.- CONCLUSIONES

Los resultados mostrados en este trabajo permitieron obtener las siguientes conclusiones:

1. El biosensor conformado por la secuencia peptídica VANRSAS, además de ser estable frente a la degradación a tiempos cortos, es específico frente a la gzmA recombinante tanto de origen murino como humano, y muestra alta sensibilidad, siendo capaz de detectar bajas concentraciones de ambas proteínas.
2. La detección de la actividad enzimática de la gzmA en muestras de lisados y sueros biológicos de origen murino y humano mediante el uso de dicho biosensor, lo convierten en un biosensor válido para el estudio de la implicación de la gzmA en patologías como la sepsis.
3. Los pacientes con sepsis muestran un incremento de la concentración de la gzmA en suero, así como un incremento de la actividad enzimática de la misma, lo que sugiere una posible implicación de la gzmA extracelular en la patogénesis de esta enfermedad.
4. Existe una correlación entre la actividad enzimática de la gzmA y el estado de los pacientes con sepsis lo que indica que la gzmA extracelular podría ser utilizada como biomarcador de pronóstico en sepsis.
5. El silenciamiento génico *in vitro* de la gzmA mediante el uso de nanocomplejos con siARN, bajo las condiciones establecidas, no ha resultado ser efectivo.
6. Las NCs de quitosano son eficientemente internalizadas en el interior de linfocitos T y células NK, en un intervalo de tiempo relativamente corto y sin mostrar toxicidad sobre las mismas, por lo que representan un sistema de vehiculización adecuado para el silenciamiento de la gzmA.
7. Las NCs y las MCs de quitosano permiten actuar de forma localizada aumentando el tiempo de retención en la zona del intestino, eliminándose por completo del organismo sin llegar a producirse su integración en la vía sistémica, lo cual disminuye el riesgo de toxicidad.
8. Las propiedades de la superficie de las nanoesferas de oro de 14 nm influyen sobre la activación de la respuesta inflamatoria sobre MØM1, sin manifestar citotoxicidad sobre los mismos.

CONCLUSIONES

9. Las AuNPs seleccionadas, con un tamaño de 14 nm recubiertas con PEG-N₃ y PEG-COOH con el 100% de la superficie saturada, son capaces de modular la producción de citocinas inflamatorias en MØM1 y MØM2 inducida por LPS.
10. Las AuNPs son capaces de inhibir la maduración de las BMDCs analizada por la expresión de las moléculas de superficie CD40, CD80, CD86 y MHCII.
11. La presencia de las AuNPs en el TME del melanoma murino B16, provoca un incremento en la expresión de determinados mediadores pro- y antiinflamatorios, así como una alteración de las distintas poblaciones celulares que lo conforman.
12. La concentración de LPS utilizada para inducir una respuesta inflamatoria en el melanoma murino B16, resulta ser clave para la obtención de una inflamación beneficiosa, capaz de provocar una remisión de los tumores, o una inflamación perjudicial, con carácter fisiopatológico.
13. Las AuNPs, administradas en los tumores B16 en combinación con bajas dosis de LPS, provocan un incremento de la respuesta inflamatoria promoviendo un mayor crecimiento de los tumores, así como una mayor expresión de algunas citocinas proinflamatorias.
14. Las AuNPs, administradas en los tumores B16 en combinación con altas dosis de LPS, presentan mayor capacidad de infiltración a lo largo de toda la masa tumoral y muestran propiedades antiinflamatorias, promoviendo un retraso del crecimiento de los tumores, un descenso de la producción de ciertas citocinas proinflamatorias y un aumento en la expresión de determinadas quimiocinas.
15. La administración de las AuNPs en tumores B16 provoca una polarización de los TAMs hacia un fenotipo M2 y un aumento de la expresión del factor antitumoral TNF- α , mejorando así la sensibilidad del melanoma al tratamiento con anti-PD-1.

ANEXOS

Capítulo 7.- ANEXOS

Anexo I

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
BMGY	20 g/L Peptona 10 g/L Extracto de levadura 13,4 g/L YNB (del inglés, "Yeast Nitrogen Base") 4 x 10 ⁻³ g/L Biotina 10 ml/L Glicerol 100mM Fosfato potásico; pH6.0
BMMY	20 g/L Peptona 10 g/L Extracto de levadura 13,4 g/L YNB 4 x 10 ⁻³ g/L Biotina 10 ml/L Metanol 100mM Fosfato potásico; pH6.0
LB	10 g/L Triptona 5 g/L Extracto de levadura 10 g/L NaCl; pH7.4
LB agar	10 g/L Triptona 5 g/L Extracto de levadura 10 g/L NaCl; 15 g/L Agar; pH7.4
LB-LS	10 g/L Triptona 5 g/L Extracto de levadura 5 g/L NaCl; pH7.4
LB-LS agar	10 g/L Triptona 5 g/L Extracto de levadura 5 g/L NaCl 15 g/L Agar; pH7.4
Medio de enriquecimiento SOC	20 g/L Triptona 5 g/L Extracto de levadura 0,5 g/L NaCl 0,95 g/L MgCl ₂ 1,2 g/L MgSO ₄ 3,6 g/L Glucosa; pH7.4
MT-PBS	150mM NaCl 16mM Na ₂ HPO ₄ 4mM NaH ₂ PO ₄ ; pH7.4
PBS 1X	150mM NaCl 8mM K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O 1,6mM KH ₂ PO ₄ ; pH7.4
Solución de lavado	PBS 0,05% (v/v) TWEEN 20
Solución de permeabilización	PBS 0,1% (p/v) Saponina 5% (v/v) SFB

ANEXOS

Solución decolorante	10% (v/v) Ácido acético glacial 25% (v/v) Metanol 2% (v/v) Glicerol
Tampón de carga lisis 3X	150mM TRIS-HCl 3% (p/v) SDS 0,3mM Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O 30mM Na ₄ P ₂ O ₇ 30mM NaF 30% (v/v) Glicerol 30% (v/v) β-Mercaptoetanol 0,06% (p/v) Azul bromofeno
Tampón de conservación	100mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glicerol
Tampón de lisis	150mM NH ₄ Cl 10mM K ₂ CO ₃ 0,1mM EDTA; pH7.2-7.4
Tampón MACS	PBS 0,5% (v/v) SFB 2mM EDTA
Tampón resolving	1,5M TRIS-HCl pH8.8
Tampón running	25mM TRIS-HCl 180mM Glicina 0,1% (p/v) SDS
Tampón stacking	0,5M TRIS-HCl pH6.8
Tampón de transferencia	48mM TRIS-HCl 39mM Glicina 0,037% (p/v) SDS 20% (v/v) Metanol; pH8.3
Tampón de trituración	100mM CaCl ₂ 70mM MgCl ₂ 40mM CH ₃ COONa; pH5.5
YPD	20 g/L Peptona 10 g/L Extracto de levadura 20 g/L Glucosa
YPD agar	20 g/L Peptona 10 g/L Extracto de levadura 20 g/L Glucosa 15 g/L Agar
YPDS	20 g/L Peptona 10 g/L Extracto de levadura 20 g/L Glucosa 183 g Sorbitol
YPDS agar	20 g/L Peptona 10 g/L Extracto de levadura 20 g/L Glucosa 183 g Sorbitol 15 g/L Agar

Anexo I.- Composición de las soluciones empleadas.

Anexo II

AMNIS®								
Canal	Longitud (nm)	405	488	561	642	785		
1	430-480			BRIGHTFIELD			PANEL ESPLENOCITOS PBMCs	
2	480-560		FTC/AF488/GFP/YFP/LysoTracker Green/MitoTrackerGreen/QD525				Bodyly	
3	560-595		PE/Cy3/AF555/DSRed	PE/Cy3/AF546/AF555/DSRed/MitoTracker Orange			CD3	
4	595-640		PE-TexRed/ECD/PE-AF610/ 7-AAD/PI/RFP/QD625/eFluor625	AF568/AF594/AF610/PE-TexRed/ECD/TexRed/ PE-AF610/RFP/mCherry/7-AAD/PI			7-AAD	
5	640-745		PE-Cy5/PE-AF647/PerCP/PerCP- Cy5.5/Draq5/QD705/eFluor650	PE-Cy5/PE-AF647/Draq5			-	
6	745-800		PE-Cy7/PE-AF750/QD800	PE-Cy7/PE-AF750		SSC	-	
7	430-505	DAPI/Hoechst/PacBlue/ AF405/eFluor405/CFP/LIVE- DEAD Violet					-	
8	505-570	PacOrange/CascadeYellow/ AF430/QD525					-	
9	570-595	BRIGHTFIELD						-
10	595-640	QD625/eFluor 625					-	
11	640-745	QD705/eFluor 650			APC/AF647/AF660/AF680/Draq5/Cy5/ PE-AF647/PE-Cy5/PerCP/PerCP-Cy5.5		AntiNK1.1/CD56	
12	745-800	QD800			APC-Cy7/APC-AF750/APC-eFluor750/ Cy7/AF750/eFluor750/PE-Cy7/ PE-AF750		-	

ANEXOS

BECKMAN GALLIOS™				PANEL MØ
Láser azul 488 nm	FL1	525(40)BP	FITC/GFP/AlexaFluor488/CFSE/MitoTracker Green	F4/80
	FL2	575(30)BP	PE/AlexaFluor555	-
	FL3	620(30)BP	PE-TexasRed/PI	-
	FL4	695(30)BP	PE-Cy5/PerCP/7-AAD/PE-Cy5.5/PerCP-Cy5.5/PerCP-Vio700	7-AAD
	FL5	755LP	PE-Cy7/PE-Vio700	-
Láser rojo 640 nm	FL6	660(20)BP	APC/AlexaFluor647/Draq5/Draq7/Cy5/Mito Tracker DeepRed	CD206/MHCII
	FL7	725(20)BP	AlexaFluor700/Draq5/Draq7/APC-AlexaFluor700	-
	FL8	750LP	APC-Cy5.5/APC-Cy7/APC-eFluor780/AlexaFluor780/Live-Dead Near IR	CD11b
Láser violeta 405 nm	FL9	450(40)BP	PacificBlue/BV421/eFluor450/CFP/CellTrace Violet/AlexaFluor405/VioBlue	-
	FL10	550(50)BP	PacificOrange/BV570/Aqua/AmCyan/Qdot565/AlexaFluor430/VioGreen	-
				+ Bloqueante Fc

BECKMAN GALLIOS™				PANEL DCs
Láser azul 488 nm	FL1	525(40)BP	FITC/GFP/AlexaFluor488/CFSE/MitoTracker Green	CD80/CD86
	FL2	575(30)BP	PE/AlexaFluor555	CD11b
	FL3	620(30)BP	PE-TexasRed/PI	-
	FL4	695(30)BP	PE-Cy5/PerCP/7-AAD/PE-Cy5.5/PerCP-Cy5.5/PerCP-Vio700	CD11c/7-AAD
	FL5	755LP	PE-Cy7/PE-Vio700	-
Láser rojo 640 nm	FL6	660(20)BP	APC/AlexaFluor647/Draq5/Draq7/Cy5/Mito Tracker DeepRed	CD40/MHCII
	FL7	725(20)BP	AlexaFluor700/Draq5/Draq7/APC-AlexaFluor700	-
	FL8	750LP	APC-Cy5.5/APC-Cy7/APC-eFluor780/AlexaFluor780/Live-Dead Near IR	-
Láser violeta 405 nm	FL9	450(40)BP	PacificBlue/BV421/eFluor450/CFP/CellTrace Violet/AlexaFluor405/VioBlue	-
	FL10	550(50)BP	PacificOrange/BV570/Aqua/AmCyan/Qdot565/AlexaFluor430/VioGreen	-
				+ Bloqueante Fc

BECKMAN GALLIOS™				PANEL POBLACIONES INMUNOLÓGICAS
Láser azul 488 nm	FL1	525(40)BP	FITC/GFP/AlexaFluor488/CFSE/MitoTracker Green	CD3/F4/80
	FL2	575(30)BP	PE/AlexaFluor555	CD4/CD8/CD11c/CD274
	FL3	620(30)BP	PE-TexasRed/PI	-
	FL4	695(30)BP	PE-Cy5/PerCP/7-AAD/PE-Cy5.5/PerCP-Cy5.5/PerCP-Vio700	7-AAD/CD11b
	FL5	755LP	PE-Cy7/PE-Vio700	-
Láser rojo 640 nm	FL6	660(20)BP	APC/AlexaFluor647/Draq5/Draq7/Cy5/MitoTracker DeepRed	NK1.1./MHCII/CD206
	FL7	725(20)BP	AlexaFluor700/Draq5/Draq7/APC-AlexaFluor700	-
	FL8	750LP	APC-Cy5.5/APC-Cy7/APC-eFluor780/AlexaFluor780/Live-Dead Near IR	-
Láser violeta 405 nm	FL9	450(40)BP	PacificBlue/BV421/eFluor450/CFP/CellTraceViolet/AlexaFluor405/VioBlue	CD45/Ly6G
	FL10	550(50)BP	PacificOrange/BV570/Aqua/AmCyan/Qdot565/AlexaFluor430/VioGreen	-
				+ Bloqueante Fc

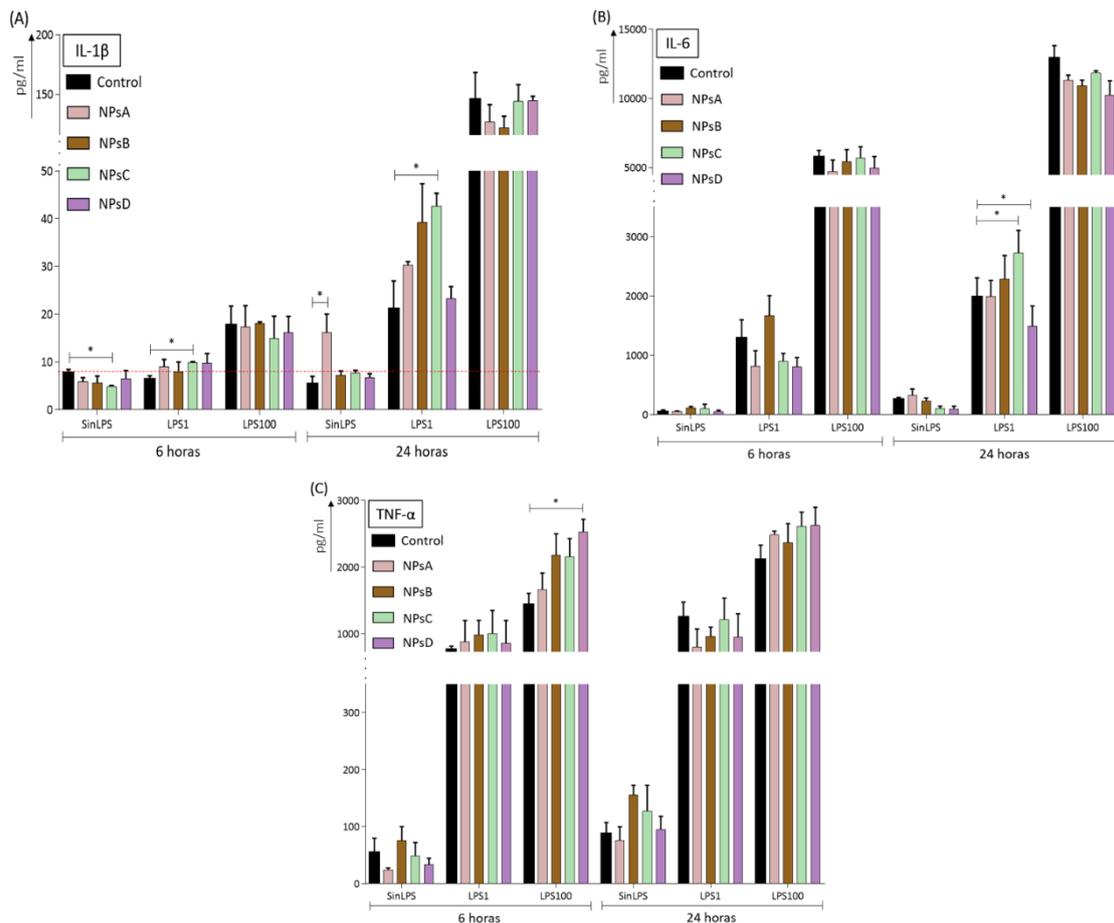
Anexo II.- Paneles de citometría para el análisis multiparamétrico de los marcajes celulares.

ANEXOS

Anexo III

Nanoesferas de oro con un tamaño de 14 nm con diferente superficie:

NPsA	Recubiertas con PEG-N ₃ y PEG-COOH con el 25% de la superficie saturada
NPsB	Recubiertas con PEG-N ₃ y PEG-COOH con el 100% de la superficie saturada
NPsC	Recubiertas con PEG-COOH con el 100% de la superficie saturada
NPsD	Recubiertas con FA-PEG-COOH con el 100% de la superficie saturada



Anexo III.- Análisis del efecto de diferentes tipos de AuNPs sobre la expresión de citocinas proinflamatorias en macrófagos M1. Se extrajo la médula ósea de ratones C57BL/6 WT de 6-8 semanas. Las células obtenidas se sembraron a una densidad de 10^6 células/ml en placas de cultivo y se mantuvieron durante 7-8 días con medio GM-CSF, tal y como se indica en el Apartado 4.4.13.1. Pasado este tiempo, las células fueron despegadas y a continuación, se sembraron en una placa de 96 pocillos para ser incubadas con LPS a diferentes concentraciones (1 y 100 ng/ml), 100 μ g/ml de AuNPs o una combinación de ambas durante 6 y 24 horas. La adición de LPS, independientemente de la concentración empleada, se realizó 1 hora antes que la adición de las AuNPs. Se recogieron los sobrenadantes y, tras su centrifugación para la eliminación de restos celulares, se cuantificaron los niveles de (A) IL-1 β , (B) IL-6 y (C) TNF- α mediante ELISA en M ϕ M1. Los gráficos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un t test de Student, donde * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

BIBLIOGRAFÍA

Capítulo 8.- BIBLIOGRAFÍA

1. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2010). doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980
2. Fearon, D. T. & Locksley, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science (80-.)*. (1996). doi:10.1126/science.272.5258.50
3. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* (2004). doi:10.1038/nrc1252
4. NORMAN, P. Immunobiology: The immune system in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* (1995). doi:10.1016/s0091-6749(95)70025-0
5. Medzhitov, R. & Janeway, C. Innate immune recognition: Mechanisms and pathways. *Immunological Reviews* (2000). doi:10.1034/j.1600-065X.2000.917309.x
6. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. & Kuby, J. *Kuby immunology*. (W.H. Freeman, 2000).
7. Abbas K. Abul, Litchman H. Andrew, P. S. *Inmunologia Celular y Molecular. Journal of Chemical Information and Modeling* (2015). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
8. Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* (1983). doi:10.1038/302575a0
9. Chidgey, A. R. & Boyd, R. L. Thymic stromal cells and positive selection. *APMIS* **109**, 481–492 (2001).
10. Sprent, J. & Kishimoto, H. The thymus and negative selection. *Immunological Reviews* (2002). doi:10.1034/j.1600-065X.2002.18512.x
11. Szabo, S. J. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* (2000). doi:10.1016/S0092-8674(00)80702-3
12. Fields, P. E., Kim, S. T. & Flavell, R. A. Cutting Edge: Changes in Histone Acetylation at the IL-4 and IFN- γ Loci Accompany Th1/Th2 Differentiation . *J. Immunol.* (2002). doi:10.4049/jimmunol.169.2.647
13. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* (2006). doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001
14. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* (1995).
15. Garcia, K. C. *et al.* Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science (80-.)*. (1998). doi:10.1126/science.279.5354.1166
16. Golias, C. H. *et al.* Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In Vivo* (2007).
17. Grakoui, A. *et al.* The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science (80-.)*. (1999). doi:10.1126/science.285.5425.221
18. Lenschow, D. J., Walunas, T. L. & Bluestone, J. A. CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION. *Annu. Rev. Immunol.* (1996). doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.233
19. Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulat, D. H. & Allison, J. P. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* (1992). doi:10.1038/356607a0
20. Thompson, C. B. *et al.* CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1989). doi:10.1073/pnas.86.4.1333
21. Kelsall, B. L., Stüber, E., Neurath, M. & Strober, W. Interleukin-12 production by dendritic

BIBLIOGRAFÍA

- cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses. in *Annals of the New York Academy of Sciences* (1996). doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb52660.x
22. Linsley, P. S. *et al.* Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* (1991). doi:10.1084/jem.173.3.721
 23. Brunet, J. F. *et al.* A new member of the immunoglobulin superfamily-CTLA-4. *Nature* (1988). doi:10.1038/328267a0
 24. Harper, K. *et al.* CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J. Immunol.* (1991).
 25. Walunas, T. L. *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* (1994). doi:10.1016/1074-7613(94)90071-X
 26. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* (1992). doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x
 27. Seidel, J. A., Otsuka, A. & Kabashima, K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: Mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Frontiers in Oncology* (2018). doi:10.3389/fonc.2018.00086
 28. Marin-Acevedo, J. A. *et al.* Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: New developments and challenges. *Journal of Hematology and Oncology* (2018). doi:10.1186/s13045-018-0582-8
 29. Ayoub, N. M., Al-Shami, K. M. & Yaghan, R. J. Immunotherapy for HER2-positive breast cancer: Recent advances and combination therapeutic approaches. *Breast Cancer: Targets and Therapy* (2019). doi:10.2147/BCTT.S175360
 30. Curtsinger, J. M., Lins, D. C. & Mescher, M. F. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: Dissociating proliferation and development of effector function. *J. Exp. Med.* (2003). doi:10.1084/jem.20021910
 31. Curtsinger, J. M., Valenzuela, J. O., Agarwal, P., Lins, D. & Mescher, M. F. Cutting Edge: Type I IFNs Provide a Third Signal to CD8 T Cells to Stimulate Clonal Expansion and Differentiation. *J. Immunol.* (2005). doi:10.4049/jimmunol.174.8.4465
 32. Kägi, D. *et al.* Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* (1994). doi:10.1038/369031a0
 33. Martínez-Lostao, L., Anel, A. & Pardo, J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin. Cancer Res.* **21**, 5047–5056 (2015).
 34. Pardo, J. *et al.* The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes and Infection* (2009). doi:10.1016/j.micinf.2009.02.004
 35. Andersen, M. H., Schrama, D., Thor Straten, P. & Becker, J. C. Cytotoxic T cells. *Journal of Investigative Dermatology* (2006). doi:10.1038/sj.jid.5700001
 36. Müllbacher, A. *et al.* Antigen-Dependent Release of IFN- γ by Cytotoxic T Cells Up-Regulates Fas on Target Cells and Facilitates Exocytosis-Independent Specific Target Cell Lysis. *J. Immunol.* (2002). doi:10.4049/jimmunol.169.1.145
 37. Simon, M. M. *et al.* Cytotoxic T Cells Specifically Induce Fas on Target Cells, Thereby Facilitating Exocytosis-Independent Induction of Apoptosis. *J. Immunol.* (2000). doi:10.4049/jimmunol.165.7.3663
 38. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* (1972). doi:10.1038/bjc.1972.33
 39. Cohen, J. J. Apoptosis. *Immunol. Today* (1993). doi:10.1016/0167-5699(93)90214-6
 40. Fadok, V. A. *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving

- TGF- β , PGE₂, and PAF. *J. Clin. Invest.* (1998). doi:10.1172/JCI11112
41. Marzo, I. & Naval, J. Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology* (2008). doi:10.1016/j.bcp.2008.06.009
 42. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* (1997). doi:10.1016/S0092-8674(00)81874-7
 43. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell* (1995). doi:10.1016/0092-8674(95)90071-3
 44. Martinez-Lostao, L., Marzo, I., Anel, A. & Naval, J. Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer. *Biochemical Pharmacology* (2012). doi:10.1016/j.bcp.2011.12.036
 45. Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* (2001). doi:10.1016/S0092-8674(01)00237-9
 46. De Saint Basile, G., Ménasché, G. & Fischer, A. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature Reviews Immunology* (2010). doi:10.1038/nri2803
 47. Stinchcombe, J. C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S. & Griffiths, G. M. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* (2006). doi:10.1038/nature05071
 48. Clark, R. H. *et al.* Adaptor protein 3-dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nat. Immunol.* (2003). doi:10.1038/ni1000
 49. Stinchcombe, J. C. *et al.* Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J. Cell Biol.* (2001). doi:10.1083/jcb.152.4.825
 50. Feldmann, J. *et al.* Munc13-4 Is Essential for Cytolytic Granules Fusion and Is Mutated in a Form of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* (2003). doi:10.1016/S0092-8674(03)00855-9
 51. Jahn, R., Lang, T. & Südhof, T. C. Membrane fusion. *Cell* (2003). doi:10.1016/S0092-8674(03)00112-0
 52. Herz, J. *et al.* Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes. *Nat. Immunol.* (2009). doi:10.1038/ni.1757
 53. Peters, P. J. *et al.* Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* (1989). doi:10.1002/eji.1830190819
 54. Smyth, M. J. *et al.* Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins. *J. Leukoc. Biol.* (2001). doi:10.1189/jlb.70.1.18
 55. Young, J. D. E., Cohn, Z. A. & Podack, E. R. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: Structural, immunological, and functional similarities. *Science* (80-.). (1986). doi:10.1126/science.2425429
 56. Lichtenheld, M. G. *et al.* Structure and function of human perforin. *Nature* (1988). doi:10.1038/335448a0
 57. Uellner, R. *et al.* Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *EMBO J.* (1997). doi:10.1093/emboj/16.24.7287
 58. Baran, K. *et al.* The Molecular Basis for Perforin Oligomerization and Transmembrane Pore Assembly. *Immunity* (2009). doi:10.1016/j.immuni.2009.03.016
 59. Voskoboinik, I. *et al.* Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J. Biol. Chem.* (2005). doi:10.1074/jbc.M413303200
 60. Andrin, C. *et al.* Interaction between a Ca²⁺-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry* (1998). doi:10.1021/bi980595z
 61. Anthony, D. A., Andrews, D. M., Watt, S. V., Trapani, J. A. & Smyth, M. J. Functional

BIBLIOGRAFÍA

- dissection of the granzyme family: Cell death and inflammation. *Immunological Reviews* (2010). doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00907.x
62. Froelich, C. J. *et al.* New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity: Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J. Biol. Chem.* (1996). doi:10.1074/jbc.271.46.29073
63. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology* (2015). doi:10.1038/nri3839
64. Liu, C. C., Walsh, C. M. & Young, J. D. E. Perforin: structure and function. *Immunol. Today* (1995). doi:10.1016/0167-5699(95)80121-9
65. Motyka, B. *et al.* Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* (2000). doi:10.1016/S0092-8674(00)00140-9
66. Trapani, J. A. *et al.* A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *J. Cell Biol.* (2003). doi:10.1083/jcb.200210150
67. Keefe, D. *et al.* Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* (2005). doi:10.1016/j.immuni.2005.08.001
68. Simon, H. G., Fruth, U., Kramer, M. D. & Simon, M. M. A secretable serine proteinase with highly restricted specificity from cytolytic T lymphocytes inactivates retrovirus-associated reverse transcriptase. *FEBS Lett.* (1987). doi:10.1016/0014-5793(87)80318-6
69. Masson, D. & Tschopp, J. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell* (1987). doi:10.1016/0092-8674(87)90544-7
70. McGuire, M. J., Lipsky, P. E. & Thiele, D. L. Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I. *J. Biol. Chem.* (1993).
71. Trapani, J. A. Granzymes: A family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biology* (2001). doi:10.1186/gb-2001-2-12-reviews3014
72. Masson, D., Peters, P. J., Geuze, H. J., Borst, J. & Tschopp, J. Interaction of Chondroitin Sulfate with Perforin and Granzymes of Cytolytic T-Cells Is Dependent on pH. *Biochemistry* (1990). doi:10.1021/bi00503a011
73. Grossman, W. J. *et al.* Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* (2004). doi:10.1182/blood-2004-03-0859
74. Pardo, J. *et al.* Granzyme B is expressed in mouse mast cells in vivo and in vitro and causes delayed cell death independent of perforin. *Cell Death Differ.* (2007). doi:10.1038/sj.cdd.4402183
75. Tschopp, C. M. *et al.* Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: Its induction and release in blood basophils and human asthma. *Blood* (2006). doi:10.1182/blood-2006-03-010348
76. Hirst, C. E. Perforin-independent expression of granzyme B and proteinase inhibitor 9 in human testis and placenta suggests a role for granzyme B-mediated proteolysis in reproduction. *Mol. Hum. Reprod.* (2001). doi:10.1093/molehr/7.12.1133
77. Hernandez-Pigeon, H. *et al.* Human keratinocytes acquire cellular cytotoxicity under UV-B irradiation: Implication of granzyme B and perforin. *J. Biol. Chem.* (2006). doi:10.1074/jbc.M512694200
78. Vernooy, J. H. J. *et al.* Increased granzyme A expression in type II pneumocytes of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2007). doi:10.1164/rccm.200602-1690C

79. Antón A, Anel A, Martínez-Lostao L, Pardo J, P. R. *Inmunología tumoral e inmunoterapia del cáncer*. (Amazing Books, 2018).
80. Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. L., Shresta, S., Russell, J. H. & Ley, T. J. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* (1994). doi:10.1016/0092-8674(94)90376-X
81. Pardo, J., Balkow, S., Anel, A. & Simon, M. M. The differential contribution of granzyme A and granzyme B in cytotoxic T lymphocyte-mediated apoptosis is determined by the quality of target cells. *Eur. J. Immunol.* (2002). doi:10.1002/1521-4141(200207)32:7<1980::AID-IMMU1980>3.0.CO;2-Z
82. Hiebert, P. R. *et al.* Granzyme B contributes to extracellular matrix remodeling and skin aging in apolipoprotein E knockout mice. *Exp. Gerontol.* (2011). doi:10.1016/j.exger.2011.02.004
83. Afonina, I. S., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunological Reviews* (2010). doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00908.x
84. Grossman, W. J. *et al.* The orphan granzymes of humans and mice. *Current Opinion in Immunology* (2003). doi:10.1016/S0952-7915(03)00099-2
85. Joeckel, L. T. *et al.* Mouse granzyme K has pro-inflammatory potential. *Cell Death Differ.* (2011). doi:10.1038/cdd.2011.5
86. Anthony, D. A. *et al.* A Role for Granzyme M in TLR4-Driven Inflammation and Endotoxemia. *J. Immunol.* (2010). doi:10.4049/jimmunol.1000430
87. Lawrence, T., Willoughby, D. A. & Gilroy, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology* (2002). doi:10.1038/nri915
88. Heidland, A., Klassen, A., Rutkowski, P. & Bahner, U. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: What is still of importance? *J. Nephrol.* (2006).
89. Feghali, C. A. & Wright, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* (1997). doi:10.2741/a171
90. Ryan, G. B. & Majno, G. Acute inflammation. A review. *Am. J. Pathol.* (1977).
91. Ferguson, L. R. Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (2010). doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.03.007
92. Janeway, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (1989). doi:10.1101/sqb.1989.054.01.003
93. Akira, S. Toll-like receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* (2003). doi:10.1074/jbc.R300028200
94. Matzinger, P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu. Rev. Immunol.* (1994). doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.005015
95. Park, J. S. *et al.* Involvement of Toll-like Receptors 2 and 4 in Cellular Activation by High Mobility Group Box 1 Protein. *J. Biol. Chem.* (2004). doi:10.1074/jbc.M306793200
96. Mariathasan, S. *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* (2006). doi:10.1038/nature04515
97. Gallucci, S. & Matzinger, P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology* (2001). doi:10.1016/S0952-7915(00)00191-6
98. Lebedev, K. A. & Ponyakina, I. D. Immunophysiology of epithelial cells and pattern-recognition receptors. *Human Physiology* (2006). doi:10.1134/S0362119706020198
99. Travis, J. On the origin of the immune system. *Science* (2009). doi:10.1126/science.324_580
100. Hoshino, K. *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J.*

BIBLIOGRAFÍA

- Immunol.* (1999).
101. Motta, V., Soares, F., Sun, T. & Philpott, D. J. Nod-like receptors: Versatile cytosolic sentinels. *Physiol. Rev.* (2015). doi:10.1152/physrev.00009.2014
 102. Franchi, L., Warner, N., Viani, K. & Nuñez, G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunological Reviews* (2009). doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x
 103. Sancho, D. & Reis e Sousa, C. Signaling by Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* (2012). doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101352
 104. Onoguchi, K., Yoneyama, M. & Fujita, T. Retinoic acid-inducible Gene-I-Like receptors. *Journal of Interferon and Cytokine Research* (2011). doi:10.1089/jir.2010.0057
 105. Chavakis, T., Bierhaus, A. & Nawroth, P. P. RAGE (receptor for advanced glycation end products): A central player in the inflammatory response. *Microbes and Infection* (2004). doi:10.1016/j.micinf.2004.08.004
 106. Plato, A., Hardison, S. E. & Brown, G. D. Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Seminars in Immunopathology* (2015). doi:10.1007/s00281-014-0462-4
 107. Roh, J. S. & Sohn, D. H. Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immune Network* (2018). doi:10.4110/in.2018.18.e27
 108. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/Cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* (1996). doi:10.1016/S0092-8674(00)80172-5
 109. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* (2005). doi:10.1093/intimm/dxh186
 110. Abdullah, Z. & Knolle, P. A. Scaling of immune responses against intracellular bacterial infection. *EMBO J.* (2014). doi:10.15252/embj.201489055
 111. Dunne, A. & O'Neill, L. A. J. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* (2003). doi:10.1126/stke.442000re1
 112. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. A human homologue of the *Drosophila* toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* (1997). doi:10.1038/41131
 113. Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology* (2014). doi:10.3389/fimmu.2014.00461
 114. Trejo-De La O, A., Hernández-Sancén, P. & Maldonado-Bernal, C. Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. *Genes and Immunity* (2014). doi:10.1038/gene.2014.10
 115. Manicassamy, S. & Pulendran, B. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Seminars in Immunology* (2009). doi:10.1016/j.smim.2009.05.005
 116. O'Neill, L. A. J. & Bowie, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* (2007). doi:10.1038/nri2079
 117. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* (1999). doi:10.1016/S1074-7613(00)80086-2
 118. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* (2006). doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
 119. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nature Immunology* (2010). doi:10.1038/ni.1863
 120. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* (2010). doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
 121. O'Neill, L. A. J., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology* (2013). doi:10.1038/nri3446

122. Schroder, K. & Tschopp, J. The Inflammasomes. *Cell* (2010). doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
123. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell* (2002). doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3
124. Latz, E., Xiao, T. S. & Stutz, A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology* (2013). doi:10.1038/nri3452
125. de Torre-Minguela, C., del Castillo, P. M. & Pelegrín, P. The NLRP3 and pyrin inflammasomes: Implications in the pathophysiology of autoinflammatory diseases. *Frontiers in Immunology* (2017). doi:10.3389/fimmu.2017.00043
126. Gasse, P. *et al.* Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2009). doi:10.1164/rccm.200808-1274OC
127. Tschopp, J. & Schroder, K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature Reviews Immunology* (2010). doi:10.1038/nri2725
128. Bauernfeind, F. G. *et al.* Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J. Immunol.* (2009). doi:10.4049/jimmunol.0901363
129. Sugimoto, M. A., Vago, J. P., Perretti, M. & Teixeira, M. M. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. *Trends in Immunology* (2019). doi:10.1016/j.it.2019.01.007
130. Khatami, M. 'Yin and Yang' in inflammation: Duality in innate immune cell function and tumorigenesis. *Expert Opin. Biol. Ther.* (2008). doi:10.1517/14712598.8.10.1461
131. Doeing, D. C., Borowicz, J. L. & Crockett, E. T. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin. Pathol.* (2003). doi:10.1186/1472-6890-3-1
132. Metchnikoff, E. The Comparative Pathology of Inflammation. *Nature* **50**, 194–195 (1894).
133. Borregaard, N. & Cowland, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* (1997). doi:10.1182/blood.v89.10.3503.3503_3521
134. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* (80-.). (2004). doi:10.1126/science.1092385
135. Bennouna, S., Bliss, S. K., Curiel, T. J. & Denkers, E. Y. Cross-Talk in the Innate Immune System: Neutrophils Instruct Recruitment and Activation of Dendritic Cells during Microbial Infection. *J. Immunol.* (2003). doi:10.4049/jimmunol.171.11.6052
136. Ethuin, F. *et al.* Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Lab. Investig.* (2004). doi:10.1038/labinvest.3700148
137. Van Gisbergen, K. P. J. M., Geijtenbeek, T. B. H. & Van Kooyk, Y. Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol.* (2005). doi:10.1016/j.it.2005.09.007
138. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* (2011). doi:10.1038/nri3024
139. Abadie, V. *et al.* Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after Mycobacterium bovis BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* (2005). doi:10.1182/blood-2005-03-1281
140. Beauvillain, C. *et al.* CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood* (2011). doi:10.1182/blood-2009-11-254490
141. Nathan, C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology* (2006). doi:10.1038/nri1785
142. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* (2013). doi:10.1038/nri3399
143. Buckley, C. D., Gilroy, D. W. & Serhan, C. N. Proresolving lipid mediators and mechanisms

BIBLIOGRAFÍA

- in the resolution of acute inflammation. *Immunity* (2014). doi:10.1016/j.immuni.2014.02.009
144. Janeway, C. *immunobiology, 5th ed. Elsevier* (2012). doi:10.1007/978-1-62703-589-7_1
145. Swirski, F. K. *et al.* Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* (80-.). (2009). doi:10.1126/science.1175202
146. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* (2005). doi:10.1038/nri1733
147. Ziegler-Heitbrock, H. W. L. *et al.* The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur. J. Immunol.* (1993). doi:10.1002/eji.1830230902
148. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* (2003). doi:10.1016/S1074-7613(03)00174-2
149. Passlick, B., Flieger, D. & Loms Ziegler-Heitbrock, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* (1989). doi:10.1182/blood.v74.7.2527.bloodjournal7472527
150. Thieblemont, N., Weiss, L., Sadeghi, H. M., Estcourt, C. & Haeffner-Cavaillon, N. CD14^{low}CD16^{high}: A cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur. J. Immunol.* (1995). doi:10.1002/eji.1830251232
151. Fingerle, G. *et al.* The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* (1993). doi:10.1182/blood.v82.10.3170.bloodjournal82103170
152. Weber, C. *et al.* Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J. Leukoc. Biol.* (2000). doi:10.1002/jlb.67.5.699
153. Serbina, N. V. & Pamer, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* (2006). doi:10.1038/ni1309
154. Faure, S. *et al.* Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science* (80-.). (2000). doi:10.1126/science.287.5461.2274
155. Tacke, F. *et al.* Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* (2007). doi:10.1172/JCI28549
156. Mildner, A. *et al.* CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain* (2009). doi:10.1093/brain/awp144
157. Ebert, RH & Florey, H. The Extravascular Development of the Monocyte Observed In vivo. *Br. J. Exp. Pathol.* **20**, 342 (1939).
158. Van Furth, R., Diesselhoff-Den Dulk, M. M. C. & Mattie, H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *J. Exp. Med.* (1973). doi:10.1084/jem.138.6.1314
159. Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M. & Muller, W. A. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* (1999). doi:10.1016/S1074-7613(00)80149-1
160. van Furth, R. *et al.* The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* (1972).
161. van Furth, R. & Cohn, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* (1968). doi:10.1084/jem.128.3.415
162. Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W. & Rossi, F. M. V. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* (2007). doi:10.1038/nn2014
163. Volkman, A., Chang, N. C., Strausbauch, P. H. & Morahan, P. S. Differential effects of chronic monocyte depletion on macrophage populations. *Lab. Investig.* (1983).

164. Sawyer, R. T., Strausbauch, P. H. & Volkman, A. Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Lab. Investig.* (1982).
165. Gordon, S. The role of the macrophage in immune regulation. in *Research in Immunology* (1998). doi:10.1016/S0923-2494(99)80039-X
166. Gordon, S. Biology of the macrophage. *J. Cell Sci.* (1986). doi:10.1242/jcs.1986.supplement_4.16
167. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol.* (2000). doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166
168. Lee, K. Y. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Med. Biol. Sci. Eng.* (2019). doi:10.30579/mbse.2019.2.1.1
169. Nau, G. J. *et al.* Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2002). doi:10.1073/pnas.022649799
170. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience* (2008). doi:10.2741/2692
171. Mosser, D. M. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* (2003). doi:10.1189/jlb.0602325
172. Mills, C. D. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease. *Crit. Rev. Immunol.* (2012). doi:10.1615/CritRevImmunol.v32.i6.10
173. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* (1992). doi:10.1084/jem.176.1.287
174. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* (2003). doi:10.1038/nri978
175. Anderson, C. F. & Mosser, D. M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J. Leukoc. Biol.* (2002). doi:10.1189/jlb.72.1.101
176. Italiani, P. & Boraschi, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology* (2014). doi:10.3389/fimmu.2014.00514
177. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* (2002). doi:10.1016/S1471-4906(02)02302-5
178. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* (2008). doi:10.1038/nri2448
179. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* (1973). doi:10.1084/jem.137.5.1142
180. Steinman, R. M. The Dendritic Cell System and its Role in Immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* (1991). doi:10.1146/annurev.iy.09.040191.001415
181. Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology* (2004). doi:10.1038/ni1141
182. Siegal, F. P. *et al.* The nature of the principal Type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science (80-)*. (1999). doi:10.1126/science.284.5421.1835
183. Corcoran, L. *et al.* The Lymphoid Past of Mouse Plasmacytoid Cells and Thymic Dendritic Cells. *J. Immunol.* (2003). doi:10.4049/jimmunol.170.10.4926
184. Mellman, I. & Steinman, R. M. Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* (2001). doi:10.1016/S0092-8674(01)00449-4
185. Shortman, K. & Liu, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology* (2002). doi:10.1038/nri746
186. Dudek, A. M., Martin, S., Garg, A. D. & Agostinis, P. Immature, semi-mature, and fully mature dendritic cells: Toward a DC-cancer cells interface that augments anticancer

BIBLIOGRAFÍA

- immunity. *Frontiers in Immunology* (2013). doi:10.3389/fimmu.2013.00438
187. Trombetta, E. S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M. & Mellman, I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* (80-). (2003). doi:10.1126/science.1080106
188. Spits, H. *et al.* Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* (2013). doi:10.1038/nri3365
189. Trinchieri, G. Biology of Natural Killer Cells. *Adv. Immunol.* (1989). doi:10.1016/S0065-2776(08)60664-1
190. Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T. & Lavrin, D. H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer* (1975). doi:10.1002/ijc.2910160205
191. Kiessling, R., Klein, E. & Wigzell, H. „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* (1975). doi:10.1002/eji.1830050208
192. Münz, C. Natural killer cells and autoimmunity. in *Natural Killer Cells* (2010). doi:10.1016/B978-0-12-370454-2.00034-X
193. Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H. G. & Bryceson, Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* (2010). doi:10.1182/blood-2009-08-238469
194. Waggoner, S. N., Cornberg, M., Selin, L. K. & Welsh, R. M. Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature* (2012). doi:10.1038/nature10624
195. Paust, S., Senman, B. & Von Andrian, U. H. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunological Reviews* (2010). doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00906.x
196. Sepulveda, F. E. *et al.* A novel immunoregulatory role for NK-cell cytotoxicity in protection from HLH-like immunopathology in mice. *Blood* (2015). doi:10.1182/blood-2014-09-602946
197. Ansar, W., Ghosh, S., Ansar, W. & Ghosh, S. Inflammation and Inflammatory Diseases, Markers, and Mediators: Role of CRP in Some Inflammatory Diseases. in *Biology of C Reactive Protein in Health and Disease* (2016). doi:10.1007/978-81-322-2680-2_4
198. Feldmann, M. & Maini, R. N. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nature Medicine* (2003). doi:10.1038/nm939
199. Lin, W. W. & Karin, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *Journal of Clinical Investigation* (2007). doi:10.1172/JCI31537
200. Cavaillon, J. M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* (2001).
201. Akdis, M. *et al.* Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2016). doi:10.1016/j.jaci.2016.06.033
202. Mackay, C. R. Chemokines: Immunology’s high impact factors. *Nature Immunology* (2001). doi:10.1038/84298
203. Berry, E. a., Guergova-Kuras, M., Huang, L. & Crofts, A. R. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu. Rev. Biochem.* (2000). doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.1005
204. Zlotnik, A. & Yoshie, O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* (2000). doi:10.1016/S1074-7613(00)80165-X
205. Hannelien, V., Karel, G., Jo, V. D. & Sofie, S. The role of CXC chemokines in the transition of chronic inflammation to esophageal and gastric cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (2012). doi:10.1016/j.bbcan.2011.10.008
206. Pöld, M. *et al.* Cyclooxygenase-2-Dependent Expression of Angiogenic CXC Chemokines ENA-78/CXC Ligand (CXCL) 5 and Interleukin-8/CXCL8 in Human Non-Small Cell Lung

- Cancer. *Cancer Res.* (2004). doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3262
207. Schenk, B. I., Petersen, F., Flad, H.-D. & Brandt, E. Platelet-Derived Chemokines CXC Chemokine Ligand (CXCL)7, Connective Tissue-Activating Peptide III, and CXCL4 Differentially Affect and Cross-Regulate Neutrophil Adhesion and Transendothelial Migration. *J. Immunol.* (2002). doi:10.4049/jimmunol.169.5.2602
208. Rossi, D. & Zlotnik, A. The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* (2000). doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.217
209. Zlotnik, A., Yoshie, O. & Nomiyama, H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biology* (2006). doi:10.1186/gb-2006-7-12-243
210. Froelich, C. J., Pardo, J. & Simon, M. M. Granule-associated serine proteases: granzymes might not just be killer proteases. *Trends Immunol.* (2009). doi:10.1016/j.it.2009.01.002
211. Vizovišek, M., Vidmar, R., Fonović, M. & Turk, B. Current trends and challenges in proteomic identification of protease substrates. *Biochimie* (2016). doi:10.1016/j.biochi.2015.10.017
212. Hayes, M. P., Berrebi, G. A. & Henkart, P. A. Induction of target cell DNA release by the cytotoxic T lymphocyte granule protease granzyme A. *J. Exp. Med.* (1989). doi:10.1084/jem.170.3.933
213. Shi, L., Kraut, R. P., Aebersold, R. & Greenberg, A. H. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and, apoptosis. *J. Exp. Med.* (1992). doi:10.1084/jem.175.2.553
214. Metkar, S. S. *et al.* Human and Mouse Granzyme A Induce a Proinflammatory Cytokine Response. *Immunity* (2008). doi:10.1016/j.immuni.2008.08.014
215. Sower, L. E., Klimpel, G. R., Hanna, W. & Froelich, C. J. Extracellular activities of human granzymes: I. Granzyme A induces IL6 and IL8 production in fibroblast and epithelial cell lines. *Cell. Immunol.* (1996). doi:10.1006/cimm.1996.0187
216. Tak, P. P. *et al.* The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.* (1999). doi:10.1046/j.1365-2249.1999.00881.x
217. Santiago, L. *et al.* Granzyme A Contributes to Inflammatory Arthritis in Mice Through Stimulation of Osteoclastogenesis. *Arthritis Rheumatol.* **69**, (2017).
218. Wilson, J. A. C. *et al.* RNA-Seq analysis of chikungunya virus infection and identification of granzyme A as a major promoter of arthritic inflammation. *PLoS Pathog.* (2017). doi:10.1371/journal.ppat.1006155
219. Hermsen, C. C. *et al.* Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental Plasmodium falciparum infections. *Clin. Exp. Immunol.* (2003). doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02160.x
220. Wensink, A. C., Hack, C. E. & Bovenschen, N. Granzymes Regulate Proinflammatory Cytokine Responses. *J. Immunol.* (2015). doi:10.4049/jimmunol.1401214
221. Lauw, F. N. *et al.* Soluble Granzymes Are Released during Human Endotoxemia and in Patients with Severe Infection Due to Gram-Negative Bacteria. *J. Infect. Dis.* (2000). doi:10.1086/315642
222. Arias, M. A. *et al.* Elucidating Sources and Roles of Granzymes A and B during Bacterial Infection and Sepsis. *Cell Rep.* (2014). doi:10.1016/j.celrep.2014.06.012
223. Müller, S. *et al.* Activated CD4+ and CD8+ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *Am. J. Pathol.* (1998).
224. Mueller, J. D. *et al.* Loss of heterozygosity and microsatellite instability in De novo versus Ex-adenoma carcinomas of the colorectum. *Am. J. Pathol.* (1998). doi:10.1016/S0002-9440(10)65711-2

BIBLIOGRAFÍA

225. Tew, G. W. *et al.* Association between Response to Etrolizumab and Expression of Integrin α e and Granzyme A in Colon Biopsies of Patients with Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* (2016). doi:10.1053/j.gastro.2015.10.041
226. Hiebert, P. R. & Granville, D. J. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends in Molecular Medicine* (2012). doi:10.1016/j.molmed.2012.09.009
227. Hagn, M. *et al.* Human B Cells Secrete Granzyme B When Recognizing Viral Antigens in the Context of the Acute Phase Cytokine IL-21. *J. Immunol.* (2009). doi:10.4049/jimmunol.0901066
228. Strik, M. C. M. *et al.* Human mast cells produce and release the cytotoxic lymphocyte associated protease granzyme B upon activation. *Mol. Immunol.* (2007). doi:10.1016/j.molimm.2007.03.024
229. Kim, W. J., Kim, H., Suk, K. & Lee, W. H. Macrophages express granzyme B in the lesion areas of atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.* (2007). doi:10.1016/j.imlet.2007.05.004
230. Bratke, K. *et al.* Increase in granzyme B+ lymphocytes and soluble granzyme B in bronchoalveolar lavage of allergen challenged patients with atopic asthma. *Clin. Exp. Immunol.* (2004). doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02468.x
231. Cooper, D. M., Petchkovsky, D. V., Hackett, T. L., Knight, D. A. & Granville, D. J. Granzyme K activates protease-activated receptor-1. *PLoS One* (2011). doi:10.1371/journal.pone.0021484
232. Rucevic, M. *et al.* Altered levels and molecular forms of granzyme K in plasma from septic patients. *Shock* (2007). doi:10.1097/01.shk.0000246905.24895.e5
233. Wensink, A. C. *et al.* Granzyme K synergistically potentiates LPS-induced cytokine responses in human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2014). doi:10.1073/pnas.1317347111
234. Bade, B. *et al.* Detection of soluble human granzyme K in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* (2005). doi:10.1002/eji.200526249
235. Bratke, K. *et al.* Granzyme K: A novel mediator in acute airway inflammation. *Thorax* (2008). doi:10.1136/thx.2007.091215
236. Krenacs, L. *et al.* The serine protease granzyme M is preferentially expressed in NK-cell, $\gamma\delta$ T-cell, and intestinal T-cell lymphomas: Evidence of origin from lymphocytes involved in innate immunity. *Blood* (2003). doi:10.1182/blood-2002-09-2908
237. Baschuk, N. *et al.* NK cell intrinsic regulation of MIP-1 α by granzyme M. *Cell Death Dis.* (2014). doi:10.1038/cddis.2014.74
238. Wensink, A. C. *et al.* Granzyme M and K release in human experimental endotoxemia. *Immunobiology* (2016). doi:10.1016/j.imbio.2016.02.006
239. Souza-Fonseca-Guimaraes, F. *et al.* Granzyme M has a critical role in providing innate immune protection in ulcerative colitis. *Cell Death Dis.* (2016). doi:10.1038/cddis.2016.215
240. Hunt, L. T. & Dayhoff, M. O. A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha1-proteinase inhibitor. *Top. Catal.* (1980). doi:10.1016/0006-291X(80)90867-0
241. Carrell, R. & Travis, J. α 1-Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends in Biochemical Sciences* (1985). doi:10.1016/0968-0004(85)90011-8
242. Bird, C. H. *et al.* Selective Regulation of Apoptosis: the Cytotoxic Lymphocyte Serpin Proteinase Inhibitor 9 Protects against Granzyme B-Mediated Apoptosis without Perturbing the Fas Cell Death Pathway. *Mol. Cell. Biol.* (1998). doi:10.1128/mcb.18.11.6387
243. Silverman, G. A. *et al.* The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a

- revised nomenclature. *Journal of Biological Chemistry* (2001). doi:10.1074/jbc.R100016200
244. Sheshadri, N. *et al.* SCCA1/SERPINB3 promotes oncogenesis and epithelial-mesenchymal transition via the unfolded protein response and IL6 signaling. *Cancer Res.* (2014). doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0798
245. Kaiserman, D. & Bird, P. I. Control of granzymes by serpins. *Cell Death and Differentiation* (2010). doi:10.1038/cdd.2009.169
246. Hirst, C. E. *et al.* The Intracellular Granzyme B Inhibitor, Proteinase Inhibitor 9, Is Up-Regulated During Accessory Cell Maturation and Effector Cell Degranulation, and Its Overexpression Enhances CTL Potency. *J. Immunol.* (2003). doi:10.4049/jimmunol.170.2.805
247. Whisstock, J. C. *et al.* Serpins flex their muscle: II. Structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions. *Journal of Biological Chemistry* (2010). doi:10.1074/jbc.R110.141408
248. Huntington, J. A., Read, R. J. & Carrell, R. W. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* (2000). doi:10.1038/35038119
249. Gettins, P. G. W. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.* (2002). doi:10.1021/cr010170+
250. Masson, D. & Tschopp, J. Inhibition of lymphocyte protease granzyme A by antithrombin III. *Mol. Immunol.* (1988). doi:10.1016/0161-5890(88)90043-0
251. Gurwitz, D., Simon, M. M., Fruth, U. & Cunningham, D. D. Protease nexin-1 complexes and inhibits T cell serine proteinase-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1989). doi:10.1016/0006-291X(89)91596-9
252. Simon, M. M. & Kramer, M. D. Granzyme A. *Methods Enzymol.* (1994). doi:10.1016/0076-6879(94)44006-9
253. Niehaus, J. Z. *et al.* SERPINB12 Is a Slow-Binding Inhibitor of Granzyme A and Hepsin. *Biochemistry* (2015). doi:10.1021/acs.biochem.5b01042
254. Kaiserman, D. *et al.* Identification of serpinb6b as a species-specific mouse granzyme A inhibitor suggests functional divergence between human and mouse granzyme A. *J. Biol. Chem.* (2014). doi:10.1074/jbc.M113.525808
255. Quan, L. T., Caputo, A., Bleackley, R. C., Pickup, D. J. & Salvesen, G. S. Granzyme B is inhibited by the cowpox virus serpin cytokine response modifier A. *J. Biol. Chem.* (1995). doi:10.1074/jbc.270.18.10377
256. Ang, L. S. *et al.* Serpina3n attenuates granzyme B-mediated decorin cleavage and rupture in a murine model of aortic aneurysm. *Cell Death Dis.* (2011). doi:10.1038/cddis.2011.88
257. Hsu, I. *et al.* Serpina3n accelerates tissue repair in a diabetic mouse model of delayed wound healing. *Cell Death Dis.* (2014). doi:10.1038/cddis.2014.423
258. de Koning, P. J. A. *et al.* Intracellular serine protease inhibitor SERPINB4 inhibits granzyme M-induced cell death. *PLoS One* (2011). doi:10.1371/journal.pone.0022645
259. Potočník, J. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). *Off. J. Eur. Union* (2011). doi:10.2777/13162
260. Feynman, R. P. There's plenty of room at the bottom. *Eng. Sci.* (1960).
261. TANIGUCHI & N. On the Basic Concept of Nano-Technology. *Proc. Intl. Conf. Prod. London, 1974* (1974).
262. Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. & Weibel, E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.* (1982). doi:10.1103/PhysRevLett.49.57
263. Scheel, H. J., Binnig, G. & Rohrer, H. Atomically flat LPE-grown facets seen by scanning tunneling microscopy. *J. Cryst. Growth* (1982). doi:10.1016/0022-0248(82)90200-7
264. Ekimov, A. & Onushcheko, A. Quantum Size Effect in Three-Dimensional Microscopic Semiconductor Crystals. *ZhETF Pis ma Redaktsiiu* **34**, 363 (1981).

BIBLIOGRAFÍA

265. Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F. & Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* (1985). doi:10.1038/318162a0
266. Whitesides, G. M. The 'right' size in nanobiotechnology. *Nature Biotechnology* (2003). doi:10.1038/nbt872
267. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* (2005). doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.012
268. Sun, T. *et al.* Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angewandte Chemie - International Edition* (2014). doi:10.1002/anie.201403036
269. Sapsford, K. E. *et al.* Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical Reviews* (2013). doi:10.1021/cr300143v
270. Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T. & Rotello, V. M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug. Chem.* (2004). doi:10.1021/bc049951i
271. Hühn, D. *et al.* Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: Focusing on the sign of the net charge. *ACS Nano* (2013). doi:10.1021/nn3059295
272. Sperling, R. A. & Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 1333–1383 (2010).
273. Langille, M. R., Personick, M. L., Zhang, J. & Mirkin, C. A. Defining rules for the shape evolution of gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* (2012). doi:10.1021/ja305245g
274. Grzelczak, M., Pérez-Juste, J., Mulvaney, P. & Liz-Marzán, L. M. Shape control in gold nanoparticle synthesis. *Chemical Society Reviews* (2008). doi:10.1039/b711490g
275. Goesmann, H. & Feldmann, C. Nanoparticulate functional materials. *Angewandte Chemie - International Edition* (2010). doi:10.1002/anie.200903053
276. Brust, M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Kiely, C. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1995). doi:10.1039/C39950001655
277. Tsuzuki, T. Commercial scale production of inorganic nanoparticles. *Int. J. Nanotechnol.* (2009). doi:10.1504/IJNT.2009.024647
278. Moran, N. *An ESF – European Medical Research Councils (EMRC) Forward Look report. Nanomedicine (London, England)* (2005). doi:10.1038/nbt0206-121
279. Hansen, S. F. *et al.* Nanomaterials in Consumer Products. in *Nanomaterials: Risks and Benefits* (2009). doi:10.1007/978-1-4020-9491-0_28
280. Vance, M. E. *et al.* Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* (2015). doi:10.3762/bjnano.6.181
281. El-Sayed, M. A. Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Acc. Chem. Res.* (2001). doi:10.1021/ar960016n
282. Sanvicens, N. & Marco, M. P. Multifunctional nanoparticles - properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in Biotechnology* **26**, 425–433 (2008).
283. M. Rosenholm, J., Sahlgren, C. & Linden, M. Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles for Combined Therapeutic, Diagnostic and Targeted Action in Cancer Treatment. *Curr. Drug Targets* (2011). doi:10.2174/138945011795906624
284. Juzenas, P. *et al.* Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2008). doi:10.1016/j.addr.2008.08.004
285. Patel, T., Zhou, J., Piepmeier, J. M. & Saltzman, W. M. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2012). doi:10.1016/j.addr.2011.12.006
286. Bhakta, G. *et al.* Multifunctional silica nanoparticles with potentials of imaging and gene

- delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* (2011). doi:10.1016/j.nano.2010.12.008
287. Zhao, L. & Ashraf, M. A. Influence of silver-hydroxyapatite nanocomposite coating on biofilm formation of joint prosthesis and its mechanism. *West Indian Med. J.* (2015). doi:10.7727/wimj.2016.179
288. Goldberg, M., Langer, R. & Jia, X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* (2007). doi:10.1163/156856207779996931
289. Chen, H. *et al.* Multifaceted applications of nanomaterials in cell engineering and therapy. *Biotechnology Advances* (2013). doi:10.1016/j.biotechadv.2012.08.002
290. Wang, M. & Thanou, M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research* (2010). doi:10.1016/j.phrs.2010.03.005
291. Misra, R., Acharya, S. & Sahoo, S. K. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discovery Today* (2010). doi:10.1016/j.drudis.2010.08.006
292. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* (1965). doi:10.1016/S0022-2836(65)80093-6
293. Duwe, H. P., Kaes, J. & Sackmann, E. Bending elastic moduli of lipid bilayers : modulation by solutes. *J. Phys.* (1990). doi:10.1051/jphys:019900051010094500
294. Felnerova, D., Viret, J. F., Glück, R. & Moser, C. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Current Opinion in Biotechnology* (2004). doi:10.1016/j.copbio.2004.10.005
295. Kraft, J. C., Freeling, J. P., Wang, Z. & Ho, R. J. Y. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2014). doi:10.1002/jps.23773
296. Hofheinz, R. D., Gnad-Vogt, S. U., Beyer, U. & Hochhaus, A. Liposomal encapsulated anti-cancer drugs. *Anti-Cancer Drugs* (2005). doi:10.1097/01.cad.0000167902.53039.5a
297. Crowe, J. H. & Crowe, L. M. Factors affecting the stability of dry liposomes. *BBA - Biomembr.* (1988). doi:10.1016/0005-2736(88)90077-6
298. Sharma, A. & Sharma, U. S. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* (1997). doi:10.1016/S0378-5173(97)00135-X
299. Romoser, A. A. *et al.* Quantum dots trigger immunomodulation of the NFκB pathway in human skin cells. *Mol. Immunol.* (2011). doi:10.1016/j.molimm.2011.02.009
300. Ballou, B. Quantum Dot Surfaces for Use In Vivo and In Vitro. *Current Topics in Developmental Biology* (2005). doi:10.1016/S0070-2153(05)70005-3
301. Fang, M., Peng, C. W., Pang, D. W. & Li, Y. Quantum dots for cancer research: current status, remaining issues, and future perspectives. *Cancer Biol. Med.* (2012). doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2012.03.001
302. Allémann, E., Leroux, J. C., Gurny, R. & Doelker, E. In Vitro Extended-Release Properties of Drug-Loaded Poly(DL-Lactic Acid) Nanoparticles Produced by a Salting-Out Procedure. *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* (1993). doi:10.1023/A:1018970030327
303. Shim, J. *et al.* Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J. Control. Release* (2004). doi:10.1016/j.jconrel.2004.03.028
304. Milão, D., Knorst, M. T., Richter, W. & Guterres, S. S. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: Development, stability study and physico-chemical characterization. *Pharmazie* (2003).
305. Kolhar, P., Doshi, N. & Mitragotri, S. Polymer nanoneedle-mediated intracellular drug delivery. *Small* (2011). doi:10.1002/smll.201100497
306. Gong, J., Chen, M., Zheng, Y., Wang, S. & Wang, Y. Polymeric micelles drug delivery system

BIBLIOGRAFÍA

- in oncology. *Journal of Controlled Release* (2012). doi:10.1016/j.jconrel.2011.12.012
307. Song, Y., Zhou, J., Li, Q., Guo, Y. & Zhang, L. Preparation and characterization of novel quaternized cellulose nanoparticles as protein carriers. *Macromol. Biosci.* (2009). doi:10.1002/mabi.200800371
308. Oyarzun-Ampuero, F. A., Brea, J., Loza, M. I., Torres, D. & Alonso, M. J. Chitosan-hyaluronic acid nanoparticles loaded with heparin for the treatment of asthma. *Int. J. Pharm.* (2009). doi:10.1016/j.ijpharm.2009.04.009
309. Rancan, F., Blume-Peytavi, U. & Vogt, A. Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* (2014). doi:10.2147/CCID.S39559
310. Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R. & Rudzinski, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* (2001). doi:10.1016/S0168-3659(00)00339-4
311. Mehnert, W. & Mäder, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2012). doi:10.1016/j.addr.2012.09.021
312. Shukla, R. *et al.* Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir* (2005). doi:10.1021/la0513712
313. Paciotti, G. F. *et al.* Colloidal gold: A novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv. J. Deliv. Target. Ther. Agents* (2004). doi:10.1080/10717540490433895
314. Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K. & Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* (2003). doi:10.1088/0022-3727/36/13/201
315. Scherer, F. *et al.* Magnetofection: Enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* (2002). doi:10.1038/sj.gt.3301624
316. Andrä, W., D'Ambly, C. G., Hergt, R., Hilger, I. & Kaiser, W. A. Temperature distribution as function of time around a small spherical heat source of local magnetic hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* (1999). doi:10.1016/S0304-8853(98)00552-6
317. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* (1991). doi:10.1038/354056a0
318. Rojas-Chapana, J., Troszczyńska, J., Firkowska, I., Morsczech, C. & Giersig, M. Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into *Escherichia coli* cells. *Lab Chip* (2005). doi:10.1039/b500681c
319. Balasubramanian, K. & Burghard, M. Biosensors based on carbon nanotubes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2006). doi:10.1007/s00216-006-0314-8
320. Bianco, A., Kostarelos, K. & Prato, M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* (2005). doi:10.1016/j.cbpa.2005.10.005
321. Zhao, J., Zhang, X., Yonzon, C. R., Hoes, A. J. & Van Duyne, R. P. Localized surface plasmon resonance biosensors. *Nanomedicine* (2006). doi:10.2217/17435889.1.2.219
322. Link, S. & El-Sayed, M. A. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* (1999). doi:10.1021/jp984796o
323. By M. Faraday, L. & Chem Roy, F. The Bakerian Lecture - Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions R. Soc. London* (1857).
324. Yang, X., Yang, M., Pang, B., Vara, M. & Xia, Y. Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine. *Chemical Reviews* (2015). doi:10.1021/acs.chemrev.5b00193
325. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* (1951). doi:10.1039/DF9511100055
326. Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* (1973). doi:10.1038/physci241020a0

327. Shenhar, R. & Rotello, V. M. Nanoparticles: Scaffolds and building blocks. *Acc. Chem. Res.* (2003). doi:10.1021/ar020083j
328. Sardar, R., Funston, A. M., Mulvaney, P. & Murray, R. W. Gold nanoparticles: Past, present, and future. *Langmuir* (2009). doi:10.1021/la9019475
329. Nguyen, D. T., Kim, D. J. & Kim, K. S. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. *Micron* (2011). doi:10.1016/j.micron.2010.09.008
330. Li, S. D. & Huang, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. in *Molecular Pharmaceutics* (2008). doi:10.1021/mp800049w
331. Eck, W. *et al.* PEGylated gold nanoparticles conjugated to monoclonal F19 antibodies as targeted labeling agents for human pancreatic carcinoma tissue. *ACS Nano* (2008). doi:10.1021/nn800429d
332. Oyelere, A. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnol. Sci. Appl.* (2008). doi:10.2147/nsa.s3707
333. Jokerst, J. V, Lobovkina, T., Zare, R. N. & Gambhir, S. S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine* **6**, 715–728 (2011).
334. Qi, Z. M. *et al.* Characterization of gold nanoparticles synthesized using sucrose by seeding formation in the solid phase and seeding growth in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B* (2004). doi:10.1021/jp035972i
335. Forestier, J. THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS WITH GOLD SALTS INJECTIONS. *Lancet* (1932). doi:10.1016/S0140-6736(01)24417-1
336. Chaffman, M., Brogden, R. N., Heel, R. C., Speight, T. M. & Avery, G. S. Auranofin: A Preliminary Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Rheumatoid Arthritis. *Drugs* (1984). doi:10.2165/00003495-198427050-00002
337. Kean, W. F. & Kean, I. R. L. Clinical pharmacology of gold. *Inflammopharmacology* (2008). doi:10.1007/s10787-007-0021-x
338. Koch, R. An address on bacteriological research. *Br. Med. J.* (1890). doi:10.1136/bmj.2.1546.380
339. Lal, S., Clare, S. E. & Halas, N. J. Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: Impending clinical impact. *Acc. Chem. Res.* (2008). doi:10.1021/ar800150g
340. Faulk, W. P. & Taylor, G. M. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* (1971).
341. Elghanian, R., Storhoff, J. J., Mucic, R. C., Letsinger, R. L. & Mirkin, C. A. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science* (80-.). (1997). doi:10.1126/science.277.5329.1078
342. Loo, C. *et al.* Gold nanoshell bioconjugates for molecular imaging in living cells. *Opt. Lett.* (2005). doi:10.1364/ol.30.001012
343. Joseph, M. M., Aravind, S. R., Varghese, S., Mini, S. & Sreelekha, T. T. PST-Gold nanoparticle as an effective anticancer agent with immunomodulatory properties. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2013). doi:10.1016/j.colsurfb.2012.11.046
344. Loo, C. *et al.* Nanoshell-Enabled Photonics-Based Imaging and Therapy of Cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* (2004). doi:10.1177/153303460400300104
345. De Chermont, Q. L. M. *et al.* Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2007). doi:10.1073/pnas.0702427104
346. Conde, J. *et al.* In vivo tumor targeting via nanoparticle-mediated therapeutic siRNA coupled to inflammatory response in lung cancer mouse models. *Biomaterials* (2013). doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.041
347. Thaxton, C. S., Georganopoulou, D. G. & Mirkin, C. A. Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. *Clinica Chimica Acta* (2006). doi:10.1016/j.cccn.2005.05.042

BIBLIOGRAFÍA

348. Bagheri, S. *et al.* Using gold nanoparticles in diagnosis and treatment of melanoma cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* (2018). doi:10.1080/21691401.2018.1430585
349. Ding, F., Deng, H., Du, Y., Shi, X. & Wang, Q. Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. *Nanoscale* (2014). doi:10.1039/c4nr02814g
350. Buschmann, M. D. *et al.* Chitosans for delivery of nucleic acids. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2013). doi:10.1016/j.addr.2013.07.005
351. Ivanova, E. P., Bazaka, K. & Crawford, R. J. Natural polymer biomaterials: advanced applications. in *New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare* (2014). doi:10.1533/9781782422662.32
352. Lehr, C. M., Bouwstra, J. A., Schacht, E. H. & Junginger, H. E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int. J. Pharm.* (1992). doi:10.1016/0378-5173(92)90353-4
353. Mohammed, M. A., Syeda, J. T. M., Wasan, K. M. & Wasan, E. K. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics* (2017). doi:10.3390/pharmaceutics9040053
354. Legrand, P., Barratt, G., Mosqueira, V., Fessi, H. & Devissaguet, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. *S.T.P. Pharma Sciences* (1999).
355. Mora-Huertas, C. E., Fessi, H. & Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* (2010). doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018
356. Couvreur, P. *et al.* Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J. Pharm. Pharmacol.* (1979). doi:10.1111/j.2042-7158.1979.tb13510.x
357. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N. & Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* (1989). doi:10.1016/0378-5173(89)90281-0
358. Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E. & Fessi, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. *Int. J. Pharm.* (2004). doi:10.1016/j.ijpharm.2004.05.016
359. De Matteis, L. *et al.* Controlling properties and cytotoxicity of chitosan nanocapsules by chemical grafting. *Mar. Drugs* (2016). doi:10.3390/md14100175
360. Singh, Y. *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release* (2017). doi:10.1016/j.jconrel.2017.03.008
361. Mao, H. Q. *et al.* Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency. *J. Control. Release* (2001). doi:10.1016/S0168-3659(00)00361-8
362. Prego, C., Torres, D. & Alonso, M. J. Chitosan nanocapsules as carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan molecular weight and type of salt on the in vitro behaviour and in vivo effectiveness. in *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* (2006). doi:10.1166/jnn.2006.429
363. Duncan, R. & Vicent, M. J. Polymer therapeutics-prospects for 21st century: The end of the beginning. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2013). doi:10.1016/j.addr.2012.08.012
364. Erdoğar, N., Akkin, S. & Bilensoy, E. Nanocapsules for Drug Delivery: An Updated Review of the Last Decade. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* (2019). doi:10.2174/1872211313666190123153711
365. Pan, Y. *et al.* Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: Chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.* (2002). doi:10.1016/S0378-5173(02)00486-6
366. Alonso, M. J. & Sánchez, A. The potential of chitosan in ocular drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* (2003). doi:10.1211/0022357022476

-
367. Peer, D. *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* (2007). doi:10.1038/nnano.2007.387
368. Howard, K. A. *et al.* RNA Interference in Vitro and in Vivo Using a Novel Chitosan/siRNA Nanoparticle System. *Mol. Ther.* (2006). doi:10.1016/j.ymthe.2006.04.010
369. Serrano-Sevilla, I., Artiga, Á., Mitchell, S. G., De Matteis, L. & de la Fuente, J. M. Natural polysaccharides for siRNA delivery: Nanocarriers based on chitosan, hyaluronic acid, and their derivatives. *Molecules* (2019). doi:10.3390/molecules24142570
370. Liu, X. *et al.* The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials* (2007). doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.004
371. Farid, M. M., Hathout, R. M., Fawzy, M. & Abou-Aisha, K. Silencing of the scavenger receptor (Class B - Type 1) gene using siRNA-loaded chitosan nanoparticles in a HepG2 cell model. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2014). doi:10.1016/j.colsurfb.2014.10.045
372. Yang, Y. *et al.* Chitosan/VEGF-siRNA nanoparticle for gene silencing. *J. Control. Release* (2011). doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.062
373. Working, P. K. *et al.* Pharmacokinetics, biodistribution and therapeutic efficacy of doxorubicin encapsulated in stealth® liposomes (doxil®). *J. Liposome Res.* (1994). doi:10.3109/08982109409037065
374. Martin, F., Huang, A., Uziely, B., Kaufman, B. & Safra, T. Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in Malignant Exudates of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-glycol Coated Liposomes. *Cancer Res.* (1994).
375. Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A. K. & Zweck, A. The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology* (2006). doi:10.1038/nbt1006-1211
376. Wang-Gillam, A. *et al.* Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): A global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* (2016). doi:10.1016/S0140-6736(15)00986-1
377. Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J. & Corrie, S. R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research* (2016). doi:10.1007/s11095-016-1958-5
378. Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W. & Borm, P. J. A. Nanotoxicology. *Occupational and Environmental Medicine* (2004). doi:10.1136/oem.2004.013243
379. Helmus, M. N. The need for rules and regulations. *Nature Nanotechnology* (2007). doi:10.1038/nnano.2007.165
380. Nel, A., Xia, T., Mädler, L. & Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* (2006). doi:10.1126/science.1114397
381. Maynard, A. D. *et al.* Safe handling of nanotechnology. *Nature* (2006). doi:10.1038/444267a
382. Hood, E. Nanotechnology: Looking as we leap. *Environmental Health Perspectives* (2004). doi:10.1289/ehp.112-a740
383. Hoet, P. H. M., Brüske-Hohlfeld, I. & Salata, O. V. Nanoparticles - Known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology* (2004). doi:10.1186/1477-3155-2-12
384. Arora, S. nanotoxicology and in vitro studies: T. of the hour, Rajwade, J. M. & Paknikar, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology* (2012). doi:10.1016/j.taap.2011.11.010
385. Oberdörster, G. *et al.* Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. in *Inhalation Toxicology* (2004). doi:10.1080/08958370490439597
386. Donaldson, K., Li, X. Y. & MacNee, W. Ultrafine (nanometre) particle mediated lung injury. *J. Aerosol Sci.* (1998). doi:10.1016/S0021-8502(97)00464-3
387. Donaldson, K., Stone, V., Seaton, A. & MacNee, W. Ambient particle inhalation and the

- cardiovascular system: Potential mechanisms. *Environ. Health Perspect.* (2001). doi:10.2307/3454663
388. Feng, X. *et al.* Central nervous system toxicity of metallic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* (2015). doi:10.2147/IJN.S78308
389. Wick, P. *et al.* Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ. Health Perspect.* (2010). doi:10.1289/ehp.0901200
390. Pietroiusti, A. *et al.* Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect mammalian embryonic development. *ACS Nano* (2011). doi:10.1021/nn200372g
391. Sarkar, A., Ghosh, M. & Sil, P. C. Nanotoxicity: Oxidative stress mediated toxicity of metal and metal oxide nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* (2014). doi:10.1166/jnn.2014.8752
392. Manke, A., Wang, L. & Rojanasakul, Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International* (2013). doi:10.1155/2013/942916
393. Stone, V. & Donaldson, K. Nanotoxicology: Signs of stress. *Nat. Nanotechnol.* (2006). doi:10.1038/nnano.2006.69
394. Balasubramanian, S. K. *et al.* Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials* (2010). doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.079
395. Zhu, M. T. *et al.* Oxidative stress and apoptosis induced by iron oxide nanoparticles in cultured human umbilical endothelial cells. in *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* (2010). doi:10.1166/jnn.2010.2488
396. Ma, X. *et al.* Gold nanoparticles induce autophagosome accumulation through size-dependent nanoparticle uptake and lysosome impairment. *ACS Nano* (2011). doi:10.1021/nn202155y
397. Li, J. *et al.* Toxicity of inorganic nanomaterials in biomedical imaging. *Biotechnology Advances* (2014). doi:10.1016/j.biotechadv.2013.12.009
398. Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology* (2007). doi:10.1038/nnano.2007.223
399. Dobrovolskaia, M. A. Pre-clinical immunotoxicity studies of nanotechnology-formulated drugs: Challenges, considerations and strategy. *J. Control. Release* (2015). doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.056
400. Smith, D. M., Simon, J. K. & Baker, J. R. Applications of nanotechnology for immunology. *Nature Reviews Immunology* (2013). doi:10.1038/nri3488
401. Chen, P., Kanehira, K. & Taniguchi, A. Role of toll-like receptors 3, 4 and 7 in cellular uptake and response to titanium dioxide nanoparticles. *Sci. Technol. Adv. Mater.* (2013). doi:10.1088/1468-6996/14/1/015008
402. Yazdi, A. S. *et al.* Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2010). doi:10.1073/pnas.1008155107
403. Yang, E. J., Kim, S., Kim, J. S. & Choi, I. H. Inflammasome formation and IL-1 β release by human blood monocytes in response to silver nanoparticles. *Biomaterials* (2012). doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.016
404. Sun, B., Wang, X., Ji, Z., Li, R. & Xia, T. NLRP3 inflammasome activation induced by engineered nanomaterials. *Small* (2013). doi:10.1002/smll.201201962
405. Khan, H. A., Abdelhalim, M. A. K., Alhomida, A. S. & Al Ayed, M. S. Transient increase in IL-1 β , IL-6 and TNF- α gene expression in rat liver exposed to gold nanoparticles. Transient increase in IL-1 β , IL-6 and TNF- α gene expression in rat liver exposed to gold nanoparticles. *Genet. Mol. Res.* (2013). doi:10.4238/2013.November.22.12
406. Khan, H. A. *et al.* Size and time-dependent induction of proinflammatory cytokines expression in brains of mice treated with gold nanoparticles. *Saudi J. Biol. Sci.* (2019).

- doi:10.1016/j.sjbs.2018.09.012
407. Ibrahim, K. E., Bakhiet, A. O., Awadalla, M. E. & Khan, H. A. A priming dose protects against gold nanoparticles-induced proinflammatory cytokines mRNA expression in mice. *Nanomedicine* (2018). doi:10.2217/nnm-2017-0332
408. Tomić, S. *et al.* Size-dependent effects of gold nanoparticles uptake on maturation and antitumor functions of human dendritic cells in vitro. *PLoS One* (2014). doi:10.1371/journal.pone.0096584
409. Sumbayev, V. V. *et al.* Gold nanoparticles downregulate interleukin-1 β -induced pro-inflammatory responses. *Small* **9**, 472–477 (2013).
410. Ni, C. *et al.* Gold nanoparticles modulate the crosstalk between macrophages and periodontal ligament cells for periodontitis treatment. *Biomaterials* (2019). doi:10.1016/j.biomaterials.2019.03.039
411. de Araújo, R. F. *et al.* Anti-inflammatory, analgesic and anti-tumor properties of gold nanoparticles. *Pharmacol. Reports* (2017). doi:10.1016/j.pharep.2016.09.017
412. Garg, A. D. *et al.* Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (2010). doi:10.1016/j.bbcan.2009.08.003
413. Bovenschen, N. & Kummer, J. A. Orphan granzymes find a home. *Immunological Reviews* (2010). doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00889.x
414. Pardo, J., Simon, M. M. & Froelich, C. J. Granzyme A is a proinflammatory protease. *Blood* (2009). doi:10.1182/blood-2009-07-231027
415. Arias, M. *et al.* The Untold Story of Granzymes in Oncoimmunology: Novel Opportunities with Old Acquaintances. *Trends in Cancer* **3**, 407–422 (2017).
416. Santiago, L. *et al.* Extracellular Granzyme A Promotes Colorectal Cancer Development by Enhancing Gut Inflammation. *Cell Rep.* **32**, 107847 (2020).
417. Auffan, M. *et al.* Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology* (2009). doi:10.1038/nnano.2009.242
418. Dreaden, E. C., Alkilany, A. M., Huang, X., Murphy, C. J. & El-Sayed, M. A. The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* (2012). doi:10.1039/c1cs15237h
419. Rivera-Gil, P. *et al.* The challenge to relate the physicochemical properties of colloidal nanoparticles to their cytotoxicity. *Acc. Chem. Res.* (2013). doi:10.1021/ar300039j
420. Soenen, S. J. *et al.* Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* (2011). doi:10.1016/j.nantod.2011.08.001
421. Soenen, S. J. *et al.* Cytotoxic effects of gold nanoparticles: A multiparametric study. *ACS Nano* (2012). doi:10.1021/nn301714n
422. Wu, S. & Letchworth, G. J. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques* (2004).
423. Invitrogen, L. T. User manual - EasySelect™ *Pichia* Expression Kit. *Cat. no. K1740-01* (2010). doi:Manual part no. 25-0172
424. Simon, M. M., Weltzien, H. U., Bühring, H. J. & Eichmann, K. Aged murine killer T-cell clones acquire specific cytotoxicity for P815 mastocytoma cells. *Nature* (1984). doi:10.1038/308367a0
425. Förster, T. Delocalized excitation and excitation transfer. *U.S. At. Energy Comm. F. Full J. Title* (1965). doi:10.2172/4626886
426. Crisalli, P. & Kool, E. T. Multi-path quenchers: Efficient quenching of common fluorophores. *Bioconjug. Chem.* (2011). doi:10.1021/bc200424r
427. Zal, T., Volkman, A. & Stockinger, B. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen.

BIBLIOGRAFÍA

- J. Exp. Med.* **180**, 2089–2099 (1994).
428. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* (1983). doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
429. Pircher, H. *et al.* Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants in vivo. *Nature* (1990). doi:10.1038/346629a0
430. Fan, Z., Beresford, P. J., Zhang, D. & Lieberman, J. HMG2 Interacts with the Nucleosome Assembly Protein SET and Is a Target of the Cytotoxic T-Lymphocyte Protease Granzyme A. *Mol. Cell. Biol.* (2002). doi:10.1128/mcb.22.8.2810-2820.2002
431. Singer, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - Journal of the American Medical Association* (2016). doi:10.1001/jama.2016.0287
432. Lopes Ferreira, F., Peres Bota, D., Bross, A., Mélot, C. & Vincent, J. L. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *J. Am. Med. Assoc.* (2001). doi:10.1001/jama.286.14.1754
433. Turner, C. T., Lim, D. & Granville, D. J. Granzyme B in skin inflammation and disease. *Matrix Biology* (2019). doi:10.1016/j.matbio.2017.12.005
434. Buzza, M. S. *et al.* Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J. Biol. Chem.* (2005). doi:10.1074/jbc.M412001200
435. Hendel, A. & Granville, D. J. Granzyme B cleavage of fibronectin disrupts endothelial cell adhesion, migration and capillary tube formation. *Matrix Biol.* (2013). doi:10.1016/j.matbio.2012.11.013
436. Hiebert, P. R., Wu, D. & Granville, D. J. Granzyme B degrades extracellular matrix and contributes to delayed wound closure in apolipoprotein e knockout mice. *Cell Death Differ.* (2013). doi:10.1038/cdd.2013.96
437. Sower, L. E. *et al.* Extracellular activities of human granzyme A. Monocyte activation by granzyme A versus alpha-thrombin. *J. Immunol.* (1996).
438. Buzza, M. S. & Bird, P. I. Extracellular granzymes: Current perspectives. in *Biological Chemistry* (2006). doi:10.1515/BC.2006.106
439. de Jong, H. K. *et al.* Expression of intra- and extracellular granzymes in patients with typhoid fever. *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2017). doi:10.1371/journal.pntd.0005823
440. Wensink, A. C. *et al.* Granzymes A and K differentially potentiate LPS-induced cytokine response. *Cell Death Discov.* (2016). doi:10.1038/cddiscovery.2016.84
441. Ong, I. L. H. & Yang, K. L. Recent developments in protease activity assays and sensors. *Analyst* (2017). doi:10.1039/c6an02647h
442. Zajac, A. J., Dye, J. M. & Quinn, D. G. Control of lymphocytic choriomeningitis virus infection in granzyme B deficient mice. *Virology* (2003). doi:10.1006/viro.2002.1754
443. Zhou, X., Ramachandran, S., Mann, M. & Popkin, D. L. Role of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) in understanding viral immunology: Past, present and future. *Viruses* (2012). doi:10.3390/v4112650
444. Osuchowski, M. F., Craciun, F., Weixelbaumer, K. M., Duffy, E. R. & Remick, D. G. Sepsis Chronically in MARS: Systemic Cytokine Responses Are Always Mixed Regardless of the Outcome, Magnitude, or Phase of Sepsis. *J. Immunol.* (2012). doi:10.4049/jimmunol.1201806
445. Novotny, A. R. *et al.* Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology* (2012). doi:10.1016/j.imbio.2011.10.019
446. Nemzek, J. A., Hugunin, K. M. S. & Opp, M. R. Modeling sepsis in the laboratory: Merging sound science with animal well-being. *Comparative Medicine* (2008).
447. Fink, M. P. Animal models of sepsis. *Virulence* (2014). doi:10.4161/viru.26083

-
448. Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E. & Karin, M. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology* (2010). doi:10.1053/j.gastro.2010.01.058
449. Fleischmann, C. *et al.* Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2016). doi:10.1164/rccm.201504-0781OC
450. Salliot, C., Dougados, M. & Gossec, L. Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheumatoid arthritis: Meta-analyses of randomised placebo-controlled trials. *Ann. Rheum. Dis.* (2009). doi:10.1136/ard.2007.083188
451. Nishino, M. *et al.* Immune-related response assessment during pd-1 inhibitor therapy in advanced non-small-cell lung cancer patients. *J. Immunother. Cancer* (2016). doi:10.1186/s40425-016-0193-2
452. Nishino, M. Immune-related response evaluations during immune-checkpoint inhibitor therapy: Establishing a 'common language' for the new arena of cancer treatment. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* (2016). doi:10.1186/s40425-016-0134-0
453. Bovenschen, N. *et al.* Granzyme K displays highly restricted substrate specificity that only partially overlaps with granzyme A. *J. Biol. Chem.* (2009). doi:10.1074/jbc.M806716200
454. Joeckel, L. T., Allison, C. C., Pellegrini, M., Bird, C. H. & Bird, P. I. Granzyme K-deficient mice show no evidence of impaired antiviral immunity. *Immunol. Cell Biol.* (2017). doi:10.1038/icb.2017.35
455. Elbashir, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* (2001). doi:10.1038/35078107
456. McCaffrey, A. P. *et al.* RNA interference in adult mice. *Nature* (2002). doi:10.1038/418038a
457. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* (2001). doi:10.1006/meth.2001.1262
458. Danhier, F. *et al.* Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *J. Control. Release* (2009). doi:10.1016/j.jconrel.2008.09.086
459. Pham, W., Medarova, Z. & Moore, A. Synthesis and application of a water-soluble near-infrared dye for cancer detection using optical imaging. *Bioconjug. Chem.* (2005). doi:10.1021/bc049700+
460. Padmanabhan, P., Grosse, J., Asad, A. B. M. A., Radda, G. K. & Golay, X. Gastrointestinal transit measurements in mice with 99mTc-DTPA-labeled activated charcoal using NanoSPECT-CT. *EJNMMI Res.* (2013). doi:10.1186/2191-219X-3-60
461. Enck, P., Merlin, V., Erckenbrecht, J. F. & Wienbeck, M. Stress effects on gastrointestinal transit in the rat. *Gut* (1989). doi:10.1136/gut.30.4.455
462. Hillyer, J. F. & Albrecht, R. M. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* (2001). doi:10.1002/jps.1143
463. Coppi, G., Iannuccelli, V., Leo, E., Bernabei, M. T. & Cameroni, R. Chitosan-alginate microparticles as a protein carrier. *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2001). doi:10.1081/DDC-100104314
464. Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V. & Peppas, N. A. Polymers for Drug Delivery Systems. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* (2010). doi:10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847
465. Joki, T. *et al.* Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat. Biotechnol.* (2001). doi:10.1038/83481
466. Illum, L., Ping, H., Nottingham & Miami. Gastroretentive controlled release microspheres for improved drug delivery. *US6207197 B1* (1998).
467. Artiga, Á. *et al.* Inkjet-Based Technology for Microencapsulation of Gold Nanoparticles within Biocompatible Hydrogels. *Part. Part. Syst. Charact.* (2020). doi:10.1002/ppsc.202000026

BIBLIOGRAFÍA

468. Hauschild, S. *et al.* Direct preparation and loading of lipid and polymer vesicles using inkjets. *Small* (2005). doi:10.1002/smll.200500093
469. Ricci, M. & Ulman, E. a. Laboratory animal diets: a critical part of your in vivo research. *Anim. Lab News* (2005).
470. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
471. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* (2000). doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
472. Beyaert, R. *et al.* Cancer risk in immune-mediated inflammatory diseases (IMiD). *Molecular Cancer* (2013). doi:10.1186/1476-4598-12-98
473. Lashinger, L. M., Rossi, E. L. & Hursting, S. D. Obesity and resistance to cancer chemotherapy: Interacting roles of inflammation and metabolic dysregulation. *Clin. Pharmacol. Ther.* (2014). doi:10.1038/clpt.2014.136
474. Deschoolmeester, V. *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes: An intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol.* (2010). doi:10.1186/1471-2172-11-19
475. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *caenorhabditis elegans*. *Nature* (1998). doi:10.1038/35888
476. Pecot, C. V., Calin, G. A., Coleman, R. L., Lopez-Berestein, G. & Sood, A. K. RNA interference in the clinic: Challenges and future directions. *Nature Reviews Cancer* (2011). doi:10.1038/nrc2966
477. Taberero, J. *et al.* First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov.* (2013). doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0429
478. Zhou, D. *et al.* Effect of combination therapy of siRNA targeting growth hormone receptor and 5-fluorouracil in hepatic metastasis of colon cancer. *Oncol. Lett.* (2015). doi:10.3892/ol.2015.3770
479. Zhang, N., Wardwell, P. R. & Bader, R. A. Polysaccharide-based micelles for drug delivery. *Pharmaceutics* (2013). doi:10.3390/pharmaceutics5020329
480. Dodane, V., Amin Khan, M. & Merwin, J. R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int. J. Pharm.* (1999). doi:10.1016/S0378-5173(99)00030-7
481. Alameh, M. *et al.* SiRNA Delivery with Chitosan: Influence of Chitosan Molecular Weight, Degree of Deacetylation, and Amine to Phosphate Ratio on in Vitro Silencing Efficiency, Hemocompatibility, Biodistribution, and in Vivo Efficacy. *Biomacromolecules* (2018). doi:10.1021/acs.biomac.7b01297
482. Cho, W. S. *et al.* Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2010). doi:10.1016/j.taap.2010.02.013
483. Wang, J. *et al.* Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol. Lett.* (2007). doi:10.1016/j.toxlet.2006.12.001
484. Zhang, X. D. *et al.* Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* (2011). doi:10.2147/ijn.s21657
485. 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. *J. Immunol.* (2007). doi:10.4049/jimmunol.178.8.5245
486. Austyn, J. M. & Gordon, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* (1981). doi:10.1002/eji.1830111013
487. Raimondo, T. M. & Mooney, D. J. Functional muscle recovery with nanoparticle-directed

- M2 macrophage polarization in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2018). doi:10.1073/pnas.1806908115
488. Chen, Y. *et al.* Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression. *Journal of Biomedical Science* (2019). doi:10.1186/s12929-019-0568-z
489. Veremeyko, T., Siddiqui, S., Sotnikov, I., Yung, A. & Ponomarev, E. D. IL-4/IL-13-dependent and independent expression of miR-124 and its contribution to M2 phenotype of monocytic cells in normal conditions and during allergic inflammation. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0081774
490. Beutler, B. & Rietschel, E. T. Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology* (2003). doi:10.1038/nri1004
491. Li, W. *et al.* Lipopolysaccharide-induced profiles of cytokine, chemokine, and growth factors produced by human decidual cells are altered by lactobacillus rhamnosus gr-1 supernatant. *Reprod. Sci.* (2014). doi:10.1177/1933719113519171
492. Hespel, C. & Moser, M. Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. *European Journal of Immunology* (2012). doi:10.1002/eji.201242480
493. Li, H. *et al.* CD11c + CD11b + Dendritic Cells Play an Important Role in Intravenous Tolerance and the Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* (2008). doi:10.4049/jimmunol.181.4.2483
494. Garrigan, K. *et al.* Functional comparison of spleen dendritic cells and dendritic cells cultured in vitro from bone marrow precursors. *Blood* (1996). doi:10.1182/blood.v88.9.3508.bloodjournal8893508
495. Nakamura, K. *et al.* Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sci.* (2002). doi:10.1016/S0024-3205(01)01454-0
496. Shetab Boushehri, M. A., Abdel-Mottaleb, M. M. A., Béduneau, A., Pellequer, Y. & Lamprecht, A. A nanoparticle-based approach to improve the outcome of cancer active immunotherapy with lipopolysaccharides. *Drug Deliv.* **25**, 1414–1425 (2018).
497. Qian, B. Z. *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* (2011). doi:10.1038/nature10138
498. Zigler, M., Villares, G. J., Lev, D. C., Melnikova, V. O. & Bar-Eli, M. Tumor immunotherapy in melanoma: Strategies for overcoming mechanisms of resistance and escape. *American Journal of Clinical Dermatology* (2008). doi:10.2165/00128071-200809050-00004
499. Murakami, T., Cardones, A. R. & Hwang, S. T. Chemokine receptors and melanoma metastasis. *Journal of Dermatological Science* (2004). doi:10.1016/j.jdermsci.2004.03.002
500. Dhawan, P. & Richmond, A. Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J. Leukoc. Biol.* (2002). doi:10.1189/jlb.72.1.9
501. Fridman, W. H., Pagès, F., Sauts-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer* (2012). doi:10.1038/nrc3245
502. Sounni, N. E. & Noel, A. Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clinical Chemistry* (2013). doi:10.1373/clinchem.2012.185363
503. Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B. & Ley, K. Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. *Frontiers in Immunology* (2019). doi:10.3389/fimmu.2019.01084
504. Ngambenjwong, C., Gustafson, H. H. & Pun, S. H. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **114**, 206–221 (2017).
505. Sumitomo, R. *et al.* PD-L1 expression on tumor-infiltrating immune cells is highly associated with M2 TAM and aggressive malignant potential in patients with resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* (2019). doi:10.1016/j.lungcan.2019.08.023
506. Topalian, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* (2012). doi:10.1056/NEJMoa1200690

BIBLIOGRAFÍA

507. Dykman, L. & Khlebtsov, N. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives. *Chemical Society Reviews* (2012). doi:10.1039/c1cs15166e
508. Patel, P. C. *et al.* Scavenger receptors mediate cellular uptake of polyvalent oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* (2010). doi:10.1021/bc1002423
509. Moyano, D. F. *et al.* Nanoparticle hydrophobicity dictates immune response. *J. Am. Chem. Soc.* (2012). doi:10.1021/ja2108905
510. Parrillo, J. E. *et al.* Septic shock in humans: Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. in *Annals of Internal Medicine* (1990). doi:10.7326/0003-4819-113-3-227
511. Fytianos, K. *et al.* Uptake efficiency of surface modified gold nanoparticles does not correlate with functional changes and cytokine secretion in human dendritic cells in vitro. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* (2015). doi:10.1016/j.nano.2014.11.004
512. Petrarca, C. *et al.* Engineered metal based nanoparticles and innate immunity. *Clinical and Molecular Allergy* (2015). doi:10.1186/s12948-015-0020-1
513. Fallarini, S. *et al.* Factors affecting T cell responses induced by fully synthetic glyco-gold-nanoparticles. *Nanoscale* (2013). doi:10.1039/c2nr32338a
514. Yen, H. J., Hsu, S. H. & Tsai, C. L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* (2009). doi:10.1002/smll.200900126
515. Nakata, S. *et al.* Chemisorption of proteins and their thiol derivatives onto gold surfaces: Characterization based on electrochemical nonlinearity. *Biophys. Chem.* (1996). doi:10.1016/S0301-4622(96)02208-9
516. Jeon, K.-I., Jeong, J.-Y. & Jue, D.-M. Thiol-Reactive Metal Compounds Inhibit NF- κ B Activation by Blocking I κ B Kinase. *J. Immunol.* (2000). doi:10.4049/jimmunol.164.11.5981
517. Bondeson, J. & Sundler, R. Auranofin inhibits the induction of interleukin 1 β and tumor necrosis factor α mRNA in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* (1995). doi:10.1016/0006-2952(95)02030-6
518. Ma, J. S. *et al.* Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF- κ B and IFN- β /STAT1 pathways in RAW264.7 cells. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* (2010). doi:10.1016/j.niox.2010.06.005
519. Pereira, D. V. *et al.* Effects of gold nanoparticles on endotoxin-induced uveitis in rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2012). doi:10.1167/iovs.12-10743
520. Moyano, D. F. *et al.* Immunomodulatory Effects of Coated Gold Nanoparticles in LPS-Stimulated In Vitro and In Vivo Murine Model Systems. *Chem* (2016). doi:10.1016/j.chempr.2016.07.007
521. Liu, Z. *et al.* Enhancement of lipopolysaccharide-induced nitric oxide and interleukin-6 production by PEGylated gold nanoparticles in RAW264.7 cells. *Nanoscale* (2012). doi:10.1039/c2nr31355c
522. Cho, W. S. *et al.* Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2009). doi:10.1016/j.taap.2008.12.023
523. Chen, X. & Gao, C. Influences of size and surface coating of gold nanoparticles on inflammatory activation of macrophages. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2017). doi:10.1016/j.colsurfb.2017.09.046
524. Li, Y. & Boraschi, D. Endotoxin contamination: A key element in the interpretation of nanosafety studies. *Nanomedicine* (2016). doi:10.2217/nnm.15.196
525. Li, Y. *et al.* Bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) binds to the surface of gold nanoparticles, interferes with biocorona formation and induces human monocyte inflammatory activation. *Nanotoxicology* (2017). doi:10.1080/17435390.2017.1401142
526. C.A., D. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology* (2009).

-
527. Joosten, L. A. B., Netea, M. G. & Dinarello, C. A. Interleukin-1 β in innate inflammation, autophagy and immunity. *Seminars in Immunology* (2013). doi:10.1016/j.smim.2013.10.018
528. Chellat, F., Merhi, Y., Moreau, A. & Yahia, L. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials* (2005). doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.044
529. Balasubramanian, V., Liu, Z., Hirvonen, J. & Santos, H. A. Bridging the Knowledge of Different Worlds to Understand the Big Picture of Cancer Nanomedicines. *Adv. Healthc. Mater.* (2018). doi:10.1002/adhm.201700432
530. Maeda, H., Sawa, T. & Konno, T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. in *Journal of Controlled Release* (2001). doi:10.1016/S0168-3659(01)00309-1
531. Juskewitch, J. E. *et al.* LPS-induced murine systemic inflammation is driven by parenchymal cell activation and exclusively predicted by early MCP-1 plasma levels. *Am. J. Pathol.* (2012). doi:10.1016/j.ajpath.2011.10.001
532. Neagu, M. *et al.* Inflammation markers in cutaneous melanoma - edgy biomarkers for prognosis. *Discoveries* (2015). doi:10.15190/d.2015.30
533. Galluzzi, L. *et al.* Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* (2014). doi:10.18632/oncotarget.2998
534. Mastelic-Gavillet, B., Balint, K., Boudousquie, C., Gannon, P. O. & Kandalaf, L. E. Personalized dendritic cell vaccines-recent breakthroughs and encouraging clinical results. *Frontiers in Immunology* (2019). doi:10.3389/fimmu.2019.00766
535. Le Guével, X. *et al.* Nanoparticle size influences the proliferative responses of lymphocyte subpopulations. *RSC Adv.* (2015). doi:10.1039/c5ra16164a
536. Villiers, C. L., Freitas, H., Couderc, R., Villiers, M. B. & Marche, P. N. Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: Effect on dendritic cell functions. *J. Nanoparticle Res.* (2010). doi:10.1007/s11051-009-9692-0
537. Leek, R. D. *et al.* Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* (1996).
538. Chen, J. *et al.* CCL18 from Tumor-Associated Macrophages Promotes Breast Cancer Metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell* (2011). doi:10.1016/j.ccr.2011.02.006
539. Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K. & Itano, N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* (2014). doi:10.3390/cancers6031670
540. Jayasingam, S. D. *et al.* Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Frontiers in Oncology* (2020). doi:10.3389/fonc.2019.01512
541. Zemek, R. M. *et al.* Sensitization to immune checkpoint blockade through activation of a STAT1/NK axis in the tumor microenvironment. *Sci. Transl. Med.* (2019). doi:10.1126/scitranslmed.aav7816
542. Duan, Q., Zhang, H., Zheng, J. & Zhang, L. Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment. *Trends in Cancer* (2020). doi:10.1016/j.trecan.2020.02.022
543. Lin, H. *et al.* Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression. *J. Clin. Invest.* (2018). doi:10.1172/JCI96113
544. Chen, S. *et al.* Combination of 4-1BB agonist and PD-1 antagonist promotes antitumor effector/memory CD8 T cells in a Poorly Immunogenic Tumor Model. *Cancer Immunol. Res.* (2015). doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0118
545. Gordon, S. R. *et al.* PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* (2017). doi:10.1038/nature22396
546. Ratner, A. & Clark, W. R. Role of TNF- α in CD8+ cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis. *J.*

BIBLIOGRAFÍA

- Immunol.* (1993).
547. Chopra, M. *et al.* Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis. *Carcinogenesis* (2013). doi:10.1093/carcin/bgt038
548. Zhao, X. *et al.* TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J. Clin. Invest.* (2012). doi:10.1172/JCI64115
549. Chen, P. L. *et al.* Analysis of immune signatures in longitudinal tumor samples yields insight into biomarkers of response and mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade. *Cancer Discov.* (2016). doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1545
550. Bertrand, F. *et al.* TNF α blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat. Commun.* (2017). doi:10.1038/s41467-017-02358-7

