TESIS DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

2024

284

Jorge Rafael Calvo Tapies

Influencia de la carencia de la granzima a, de la granzima b y de la perforina en el desarrollo de la artrósis de rodilla en un modelo experimental

Director/es

García-Álvarez García, Felícito

Martínez Lostao, Luis

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

ISSN 2254-7606

Prensas de la Universidad
Universidad Zaragoza

Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Universidad Zaragoza
1542

Tesis Doctoral

INFLUENCIA DE LA CARENCIA DE LA GRANZIMA A, DE LA GRANZIMA B Y DE LA PERFORINA EN EL DESARROLLO DE LA ARTRÓSIS DE RODILLA EN UN MODELO EXPERIMENTAL

Autor

Jorge Rafael Calvo Tapies

Director/es

García-Álvarez García, Felícito
Martínez Lostao, Luis

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina

2024

Repositorio de la Universidad de Zaragoza – Zaguan http://zaguan.unizar.es

Universidad Zaragoza
1542

Tesis Doctoral

INFLUENCIA DE LA CARENCIA DE LA GRANZIMA A, DE LA GRANZIMA B Y DE LA PERFORINA EN EL DESARROLLO DE LA ARTROSIS DE RODILLA EN UN MODELO EXPERIMENTAL.

Autor

Jorge Rafael Calvo Tapies

Director/es

Dr. D. Felícito García-Álvarez García

Dr. D. Luis Martínez Lostao

Facultad de Medicina / Escuela de Doctorado

Año 2023

El Dr. D. Felícito García-Álvarez García

Profesor Titular de Ortopedia y Traumatología del Departamento de Cirugía de la Universidad de Zaragoza y Facultativo Especialista de Área de Cirugía Ortopédica y Traumatología en el Hospital Clínico Univesitario ¨Lozano Blesa¨

CERTIFICA:

Que Don Jorge Rafael Calvo Tapies, Licenciado en Medicina por la Universidad de Zaragoza, ha realizado el presente trabajo de investigación sobre: "INFLUENCIA DE LA CARENCIA DE LA GRANZIMA A, DE LA GRANZIMA B Y DE LA PERFORINA EN EL DESARROLLO DE LA ARTROSIS DE RODILLA EN UN MODELO EXPERIMENTAL", que va a presentar como Tesis Doctoral, bajo mi dirección. Dicho trabajo ha dado unos resultados que convenientemente discutidos han llevado a conclusiones originales. Todo ello posee un enorme interés clínico y científico, siendo una patología de gran impacto en la sociedad.

.

Fdo: Felícito García-Alvarez García

En Zaragoza, a de diciembre de dos mil veintitrés

El Dr. D. Luis Martínez Lostao

Profesor Titular de Inmunología del Departamento de Microbiología, Pediatría, Radiología y Salud Pública de la Universidad de Zaragoza y Facultativo Especialista de Área de Inmunología en el Hospital Clínico Universitario ¨Lozano Blesa¨

CERTIFICA:

Que Don Jorge Rafael Calvo Tapies, Licenciado en Medicina por la Universidad de Zaragoza, ha realizado el presente trabajo de investigación sobre: "INFLUENCIA DE LA CARENCIA DE LA GRANZIMA A, DE LA GRANZIMA B Y DE LA PERFORINA EN EL DESARROLLO DE LA ARTROSIS DE RODILLA EN UN MODELO EXPERIMENTAL", que va a presentar como Tesis Doctoral, bajo mi dirección. Dicho trabajo ha dado unos resultados que convenientemente discutidos han llevado a conclusiones originales. Todo ello posee un enorme interés clínico y científico, siendo una patología de gran impacto en la sociedad.

Fdo: Luis Martínez Lostao

En Zaragoza, a de diciembre de dos mil veintitrés

A mis padres, mi mujer y mis amigos,
por acompañarme en este largo camino y haberme hecho llegar hasta aquí.

Índice de las principales abreviaturas

ACLT: *anterior cruciate ligament section*

AR: Artritis reumatoide

BLT: benzyloxycarbonyl-L-lysine thiobenzyl ester

CCL2: *chemokine ligand 2*

CEA: Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal

Células NK: células natural killer

CFL: cóndilo femoral lateral

CFM: cóndilo femoral medial

CIA: *collagen induced arthritis*

CIBA: Centro de Investigación Biomédica de Aragón

CMSE: enteropatía sensible a la proteína de la leche de vaca

DAMPs: *Damage Associated Molecular Patterns*

DHT: dihidrotestosterona

DMM: desestabilización del menisco medial

DMO: densidad mineral ósea

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EB: enfermedad de Behcet

EC: enfermedad celiaca

EE: error estándar

EGF: *epidermal growth factor*

F: hembra

FM: fémur medial

FL: fémur lateral

FT: femorotibial/es

GzmA: granzima A

GzmB: granzima B

GzmA $^{-/-}$: KO granzima A

GzmB $^{-/-}$: KO granzima B

GzmK: granzima K

GzmM: granzima M

IFN γ: interferón gamma

IL-1: interleuquina 1

IL-1β: interleuquina 1 beta

IL-6: interleuquina 6

IL-8: interleuquina 8

iNOS: sintasa inductible de óxido nítrico

KDa: kiloDalton

KO: *knockout*

LCA: ligamento cruzado anterior

LCP: ligamento cruzado posterior

LMM: ligamento menisco medial

LMTL: ligamento meniscotibial lateral

LPS: lipopolisacárido

M: macho

MAC: *membrane attack complex*

MCP: proteína quimioatrayente de monocitos 1

MMP: meniscectomía medial parcial

LCMS: sección ligamento colateral medial

MI: menisco interno

ME: menisco externo

OARSI: *Osteoarthritis Research Society International*

ORX: orquiectomizado

OVX: ovariectomizado

PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PAR 1*: Protease-Activated Receptor 1*

PRRs: *Pattern Recognition Receptors*

Perf: perforina

Perf $^{-/-}$: KO perforina

PTL: platillo tibial lateral

PTM: platillo tibial medial

QALYs: *Quality-Adjusted Life-Year*

TL: tibia lateral

TM: tibia medial

TNF-α: factor necrosis tumoral alfa

ROS: especies de oxígeno reactivo

VEB: virus Epstein Barr

VIH: virus inmunodeficiencia humana

-wt-: *wild type*

Índice de contenidos

INTRODUCCIÓN…… 21

Antecedentes y situación actual del tema…….. 23

Fisiopatología de la artrosis…….. 26

Mecanismos efectores de las células citotóxicas……. 30

Sistemas de exocitosis granular…… 33

Perforina……..34

Granzimas……..35

Granzima A……..36

Granzima B…… 37

Otras granzimas con propiedades proinflamatorias…… 39

Modelos de artrosis en el ratón…… 41

Desestabilización quirúrgica del menisco medial (DMM)…… 45

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS…… 50

MATERIALES Y MÉTODOS…… 53

Animales…… 55

Procedimiento quirúrgico……. 56

Análisis histopatológico…… 62

Análisis estadístico……. 64

RESULTADOS…… 66

Validación del modelo DMM para inducción de artrosis en el ratón…… 68

Papel del sexo en el desarrollo de artrosis en un modelo DMM…….. 71

Comparativa entre rodillas derechas de ratones control -wt- macho y hembra……. 71

Comparativa entre rodillas derechas de ratones GzmA -/- macho y hembra……. 78

Comparativa entre rodillas derechas de ratones GzmB -/- macho y hembra……. 84

Comparativa entre rodillas derechas de ratones Perf -/- macho y hembra…… 90

Papel de la Gzm A, Gzm B y Perf en el desarrollo de artrosis mediante el modelo DMM, ratones macho (M)…… 96

Papel de la Gzm A, Gzm B y Perf en el desarrollo de artrosis mediante el modelo DMM, ratones hembra (F)…… 108

Resumen de resultados…… 122

DISCUSIÓN…… 128

Muestra y tamaño muestral…… 130

Procedimiento de inducción de la artrosis mediante el modelo DMM…… 131

Papel del sexo en un modelo DMM de inducción de artrosis en ratones…… 134

Papel de GzmA en la inducción de artrosis en ratón mediante DMM…… 136

Papel de la GzmB en la inducción de artrosis en ratón mediante DMM…… 140

Papel de la perforina en la inducción de artrosis en ratón mediante DMM……..142

Limitaciones del estudio…… 144

CONCLUSIONES…… 146

APÉNDICE…… 151

Conflicto de intereses…… 153

Atribución imágenes licencia libre Wikimedia Commons…… 153

Agradecimientos……153

Bibliografía…… 153

Índice de figuras

Figura 1: Fisiopatología de la OA en la rodilla. Ilustración realizada por el Dr. Luis Martínez Lostao..... 29

Figura 2: Mecanismos efectores células citotóxicas..... 32

Figura 3: Sinapsis inmunológica..... 33

Figura 4: Ratón anestesiado en cámara de gas con isofluorano 2%..... 56

Figura 5: Colocación del animal en mesa quirúrgica 57

Figura 6: Abordaje quirúrgico de rodilla derecha (A) y sección del LMM (B)..... 57

Figura 7: Cierre de incisión quirúrgica mediante sutura no reabsorbible de 3/0..... 58

Figura 8: Retirada de rodilla izquierda mediante sección a nivel de fémur distal (A) y tibia proximal (B).....59-60

Figura 9: Orientación de la muestra obtenida en el casette en plano frontal/coronal previa a su procesado y análisis histopatológico..... 61

Figura 10: Comparación de la severidad de la artrosis según el estadio OARSI de las rodillas derechas e izquierdas en los ratones macho y hembra..... 68

Figura 11: Corte histológico de rodilla izquierda (no intervenida) de ratón control –wt-..... 69

Figura 12: Corte histológico de rodilla derecha (intervenida) de ratón control -wt-..... 69

Figura 13: Corte histológico de rodilla izquierda (no intervenida) de ratón macho GzmA $^{-/-}$..... 70

Figura 14: Corte histológico de rodilla derecha (intervenida) de ratón hembra Gzm A$^{-/-}$..... 70

Figura 15: Comparativa entre ratones –wt- macho (M) y hembra (F) en los cuadrantes FT en las diferentes escalas utilizadas en el estudio..... 72

Figura 16: Valores en la escala de Glasson en ratones macho (M) y hembra (F) control –wt- en los diferentes cuadrantes de la rodilla derecha intervenida..... 76

Figura 17: Corte histológico de rodilla derecha, lado medial (A) y lado lateral (B) de ratón –wt- hembra..... 77

Figura 18: Corte histológico de rodilla derecha de ratón macho –wt-..... 78

Figura 19: Comparativa entre ratones GzmA$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F) en los cuadrantes FT en las diferentes escalas utilizadas en el estudio…… 79

Figura 20: Corte histológico de rodilla derecha de ratón hembra GzmA $^{-/-}$ lado medial (A) y lado lateral (B)…… 83

Figura 21: Corte histológico de rodilla derecha de ratón macho GzmA $^{-/-}$… 84

Figura 22: Comparativa entre ratones GzmB$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F) en los cuadrantes FT en las diferentes escalas utilizadas en el estudio…… 85

Figura 23: Corte histológico comparativo entre rodillas derechas de ratones Gzm B$^{-/-}$ hembra (A) y macho (B)…… 89

Figura 24: Comparativa entre ratones Perf$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F) en los cuadrantes FT en escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson…… 90

Figura 25: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lado lateral (C) de ratón hembra Perf$^{-/-}$ …… 94

Figura 26: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lado lateral (C) de ratón macho Perf$^{-/-}$…… 95

Figura 27: Comparativa en la escala OARSI de los 4 cuadrantes FT de rodillas derechas de las 4 cepas de ratones macho…… 96

Figura 28: Comparativa en score OARSI (grado x estadio) y estadio OARSI de los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de las 4 cepas de ratones macho…… 97

Figura 29: Comparativa en la escala de Glasson de los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de las 4 cepas de ratones macho…… 98

Figura 30: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lateral (C) de ratón –wt-macho …… 105

Figura 31: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado femoral (B) y tibial (C) de ratón GzmA$^{-/-}$ macho…… 106

Figura 32: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lateral (C) de ratón GzmB$^{-/-}$ macho …… 107

Figura 33: Corte histológico de rodilla derecha de ratón Perf$^{-/-}$ macho …. 108

Figura 34: Comparativa en escala OARSI de los 4 cuadrantes FT de rodillas derechas de ratones hembra …… 109

Figura 35: Comparativa en score OARSI (grado x estadio) y estadio OARSI de los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de ratones hembra …… 110

Figura 36: Comparativa en la escala de Glasson de los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de ratones hembra..... 111

Figura 37: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lateral (C) de ratón –wt- hembra 118

Figura 38: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lateral (C) de ratón GzmA$^{-/-}$ hembra 119

Figura 39: Corte histológico de la rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lateral (C) de ratón GzmB$^{-/-}$ hembra 120

Figura 40: Corte histológico de la rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lateral (C) de ratón Perf$^{-/-}$ hembra 121

Figura 41: Puntuación en la escala de Glasson en ratones macho (M) y hembra (F) GzmA $^{-/-}$, Gzm B$^{-/-}$ y Perf$^{-/-}$ en los diferentes cuadrantes FT de las rodillas derechas (DMM) 124

Figura 42: Tinción con O-safranina realizada en las rodillas derechas (DMM) de los ratones de los grupos control –wt- y GzmA $^{-/-}$ hembra y macho, y Gzm B $^{-/-}$ hembra..... 125

Figura 43: Gráfico comparativo de las rodillas derechas (DMM) de ratones macho (M) y hembra (F) control (C), gzmA $^{-/-}$ (A), gzmB $^{-/-}$ (B), perf $^{-/-}$ (P) respecto al estadio OARSI..... 126

Índice de tablas

Tabla 1: Valores medios obtenidos en los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones macho (M) y hembra (F) –wt-…… 73

Tabla 2: Comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones control –wt- macho (M) y hembra (F)…… 74

Tabla 3: Comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones control –wt- macho (M) y hembra (F)…… 75

Tabla 4: score OARSI (grado x estadio) en las rodillas derechas del grupo control…… 76

Tabla 5: Valores medios obtenidos en cada uno de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones GzmA$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F)…… 80

Tabla 6: Comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en GzmA $^{-/-}$ macho (M) y hembra (F)…… 81

Tabla 7: Comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones GzmA$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F)…… 82

Tabla 8: Valores medios obtenidos en cada uno de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones GzmB$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F)…… 86

Tabla 9: Comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en GzmB $^{-/-}$ macho (M) y hembra (F)…… 87

Tabla 10: Comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones GzmA$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F)…… 88

Tabla 11: Valores medios obtenidos en cada uno de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones Perf$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F)…… 91

Tabla 12: Comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones Perf $^{-/-}$ macho (M) y hembra (F)…… 92

Tabla 13: Comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones Perf$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F).. 93

Tabla 14: Valores en la escala OARSI, estadio OARSI y score OARSI en los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de las 4 cepas de ratones macho….99

Tabla 15: Valores en las escala de Glasson en los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de las 4 cepas de ratones macho…… 100

Tabla 16: Comparativa de las diferentes cepas de las rodillas derechas (intervenidas) de los ratones macho en escala OARSI y estadio OARSI 101

Tabla 17: Comparativa de las diferentes cepas de las rodillas derechas (intervenidas) de los ratones hembra en score OARSI y escala Glasson 102

Tabla 18: Comparativa entre las distintas cepas de las rodillas derechas (intervenida) de ratones macho en la escala OARSI y estadio OARSI…… 103

Tabla 19: Comparativa entre las distintas cepas de las rodillas derechas (intervenida) de ratones macho en score OARSI y escala Glasson…… 104

Tabla 20: Valores en la escala OARSI, estadio OARSI y score OARSI en los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de ratones hembra…… 112

Tabla 21: Valores en la escala de Glasson en los 4 cuadrantes FT de las rodillasderechas de los ratones hembra …… 113

Tabla 22: Comparativa de rodillas derechas (intervenidas) de las diferentes cepas de los ratones hembra en escala OARSI y estadio OARSI…… 114

Tabla 23: Comparativa de rodillas derechas (intervenidas) de las diferentes cepas de los ratones hembra en score OARSI y escala Glasson…… 115

Tabla 24: Comparativa de rodillas derechas (intervenidas) de las diferentes cepas de los ratones hembra en escala OARSI y estadio OARSI…… 116

Tabla 25: Comparativa de rodillas derechas (intervenidas) de las diferentes cepas de los ratones hembra en score OARSI y escala Glasson…… 117

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La artrosis es una enfermedad degenerativa osteoarticular altamente prevalente en todo el mundo y una causa importante de discapacidad que puede influir de forma negativa en el bienestar físico y psíquico de los pacientes que la sufren. Se caracteriza por el deterioro progresivo y la pérdida de cartílago articular con cambios estructurales y funcionales concomitantes en toda la articulación, incluida la sinovial, el menisco (en la rodilla), los ligamentos periarticulares y el hueso subcondral (Buckwalter y Mankin, 1998). Se trata de la enfermedad articular crónica más común y sigue siendo uno de los pocos trastornos crónicos del envejecimiento que todavía no tiene un tratamiento eficaz que consiga retardar la progresión de la enfermedad.

La artrosis es la principal causa de discapacidad crónica a nivel mundial en personas mayores de 70 años y ha sido designada como "enfermedad prioritaria" por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (informe OMS/EDM/PAR/2004.71). La artrosis es una de las diez enfermedades más incapacitantes en países industrializados. En el estudio *Global Burden of Disease* de 2010, la artrosis de cadera y rodilla se clasificaron como las undécimas contribuyentes a la discapacidad global (Cross et al., 2010). La prevalencia de artrosis en el mundo aumenta en paralelo al aumento en el número de personas de 60 años o más y el aumento de la obesidad.

Se estima que en los Estados Unidos de Norteamérica 30,8 millones de adultos la padecen, y 300 millones de personas en todo el mundo conviven con ella (Spencer et al., 2017). La artrosis representa uno de los mayores 5 costes sanitarios en Europa. En el Reino Unido, un tercio de las personas de 45 años o más (8,75 millones de personas) han buscado tratamiento para la artrosis, y al menos la mitad de estos individuos tienen artrosis de rodilla (Cross et al., 2010).

La artrosis puede afectar a las articulaciones pequeñas, medianas y grandes, aunque en lo referente a la sintomatología dolorosa, la rodilla es la articulación que se ve afectada con mayor frecuencia. Hasta el 10% de los hombres y 13% de las mujeres mayores de 60 años en Estados Unidos, presentan una artrosis sintomática en la rodilla (Zhang y Jordan, 2010). De

hecho, la prevalencia de la artrosis de rodilla se ha duplicado cuando se compara la existente en los primeros años de la era industrial (1800-1900) con la era moderna postindustrial actual, incluso después de ajustar las prevalencias por edad y obesidad (Wallace et al., 2017).

La rodilla es la articulación sinovial más grande del ser humano y está formada por estructuras óseas (fémur distal, tibia proximal y rótula), por cartílago (menisco y cartílago libre), por ligamentos, así como por la almohadilla de grasa infrapatellar y la membrana sinovial que es la responsable de la producción del líquido sinovial que lubrica y nutre el cartílago vascular. Sin embargo, a pesar de presentar una estructura bien preparada para el movimiento, considerando el uso frecuente y el alto nivel de estrés mecánico de esta articulación, la rodilla es una localización frecuente de distintas patologías que producen dolor, entre ellas, la artrosis (Rubin, 2005).

En España, según el estudio EPISER2016 (Blanco et al., 2020), se estima que la prevalencia de artrosis sintomática es alrededor del 29%. La prevalencia de artrosis cervical fue del 10,10% y de artrosis-lumbar del 15,52%. Ambas son más frecuentes en mujeres y a mayor edad, así como en personas con niveles de estudios bajos y obesidad. La prevalencia de artrosis de cadera fue del 5,13% y la de artrosis de rodilla del 13,83%. Éstas se asocian con el sexo femenino, el sobrepeso y la obesidad y tienen menor frecuencia en individuos con nivel de estudios alto y aumentan con la edad. La prevalencia de la artrosis de mano fue del 7,73%. Es más frecuente en mujeres, obesas, con bajo nivel de estudios y mayor edad (Blanco et al., 2020). Por otra parte, el incremento de la actividad deportiva en la sociedad actual contribuye también al incremento de la artrosis de rodilla (Vannini et al., 2016). El 45% de la población general española practica un deporte y el 68% de ellos sufre una lesión anual. Se estima que por cada 1000 horas de entrenamiento se producen hasta 35 lesiones articulares y esas lesiones cuando se producen en la rodilla, suponen un incremento mantenido del estrés mecánico que sufre esta articulación, lo que incrementa significativamente el riesgo de padecer artrosis en el futuro (Tveit et al., 2012).

Los recursos y costes que supone el manejo de dicha patología para los sistemas de salud son elevados. Se estima que la artrosis supone un

coste anual de $303 billones de dólares por lo que se necesitan esfuerzos continuos para reducir su aparición, el dolor y la pérdida de la función que produce esta enfermedad degenerativa crónica y debilitante (Murphy et al., 2018).

En definitiva, las consecuencias derivadas de la artrosis de rodilla suponen una importante carga socio-sanitaria en la sociedad actual implicando una pérdida de 7,5 millones de QALYs (*Quality-Adjusted Life-Year*) debido a la inactividad física derivada de la presencia de una artrosis sintomática (Losina et al., 2020). Dado que la artrosis es una enfermedad progresiva y en su etapa final los pacientes están gravemente limitados por el dolor crónico y la discapacidad que éste supone, el reemplazo quirúrgico total de la rodilla suele ser la única alternativa terapéutica lo que a su vez supone un enorme aumento de la carga socio-sanitaria. En este sentido, y como ejemplos, se espera que el crecimiento previsto de los remplazos de rodilla en Australia sea del 276% para 2030, con un coste para la sanidad de 5.320 millones de dólares (Ackerman et al., 2019). En el caso de Estados Unidos se espera que el aumento de los remplazos de rodilla en el período de 2012 a 2050 sea del 855% siendo más de la mitad de los pacientes intervenidos menores de 65 años (Inacio et al., 2017). Dado el incremento de la incidencia y prevalencia de la artrosis, los sistemas sanitarios se están reformando especialmente en lo que se refiere al modelo de asistencia que se puede proporcionar a estos pacientes (Ganz et al., 2006).

FISIOPATOLOGÍA DE LA ARTROSIS

Antiguamente existía la creencia de que la artrosis era simplemente una enfermedad de "desgaste". Se pensaba que la sobrecarga crónica y el deterioro de la biomecánica de la articulación conducían a la destrucción del cartílago articular y la inflamación resultante. Esto posteriormente conducía a la rigidez, hinchazón y pérdida de movilidad. Actualmente se sabe que la artrosis es un proceso mucho más complejo compuesto por factores inflamatorios, biomecánicos y metabólicos (Ali et al., 2016).

La artrosis produce una degradación progresiva y severa en el cartílago articular a lo largo de la enfermedad. El cartílago articular es un cartílago liso que se encuentra en los extremos de los huesos largos y en las superficies intervertebrales. Proporciona una superficie de lubricación y baja fricción para la articulación al mismo tiempo que permite distribuir la transmisión de cargas pesadas. Aunque la vida media del colágeno dentro del cartílago es larga, se cura muy lentamente, si es que lo hace, incluso con lesiones menores. A pesar de que el cartílago articular puede tolerar un enorme estrés intenso repetitivo, manifiesta una notable incapacidad para curar incluso con una lesión menor (Buckwalter et al., 1998). Esto hace que las articulaciones sean especialmente sensibles a procesos degenerativos y el desarrollo de artrosis. La causa principal de la artrosis no se entiende completamente. Sin embargo, las fuerzas biomecánicas que producen niveles inapropiados de estrés en las articulaciones (por ejemplo, soporte de carga excesiva o anormal, alteraciones posturales u ortopédicas o lesiones traumáticas) se cree que interactúan con otros factores ambientales, sistémicos (es decir, factores bioquímicos y metabólicos) y genéticos para contribuir a la patogenia de la artrosis (Felson, 2013).

Clásicamente se han descrito numerosos factores de riesgo que parecen estar asociados con un mayor riesgo de desarrollo de artrosis. Estos factores de riesgo pueden ser modificables o no.

Los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de artrosis son la edad, el género, el sobrepeso/obesidad, traumatismos/lesiones deportivas (y la consiguiente inestabilidad articular y laxitud muscular), ciertas ocupaciones que producen estrés repetitivo en una articulación particular, factores genéticos, las deformidades óseas, enfermedades

metabólicas (por ejemplo, la diabetes), trastornos endocrinos y haber padecido previamente otras enfermedades reumáticas como la artritis reumatoide y la gota (Conaghan et al., 2013). La mayoría de los tipos de artritis son más comunes en mujeres y el 60% de todas las personas con artritis son mujeres por lo que quizás no sea de extrañar que el sexo femenino también represente un factor de riesgo significativo para la artrosis (Teichtahl et al., 2005). Se ha hipotetizado que la leptina puede ser un factor sistémico o local que medie el vínculo metabólico entre la obesidad y la artrosis (Teichtahl et al. 2005). La leptina y otras adipocitoquinas (adipoquinas) en realidad pueden ser los vínculos perdidos que den cuenta de las diferencias asociadas al sexo en el desarrollo de la enfermedad (Terlain et al., 2005).

Algunos de los anteriores son factores de riesgo no modificables para la desarrollo de la artrosis. Existe evidencia clínica que sugiere que el riesgo de desarrollar artrosis puede mitigarse y reducirse controlando el peso, evitando la obesidad/sobrepeso, manteniendo adecuados niveles de movilidad y evitando el sedentarismo. El reto se encuentra en controlar las comorbilidades como por ejemplo la diabetes y la enfermedad cardiovascular y mitigar los riesgos de lesión articular. Algunos de éstos, es probable que influyan en el curso de la enfermedad. Enfoques experimentales utilizando modelos animales y estudios clínicos son necesarios para investigar los mecanismos subyacentes con el fin de formular nuevas estrategias de prevención de la artrosis (Mobasheri y Batt, 2016).

La implicación de la inflamación en el desarrollo de otras patologías articulares como la artritis reumatoide (AR) ha sido demostrada claramente en la literatura científica, pero no ha sido hasta hace unos pocos años cuando se ha descrito que dicha inflamación también juega un papel importante en la patogenia de la artrosis (Goldring y Otero, 2011; Houard et al., 2013; Robinson et al., 2016). De hecho, la Sociedad Internacional de Investigación en Artrosis (OARSI, del inglés *Osteoarthritis Research Society International*), define la artrosis como una patología que afecta a las articulaciones y que se caracteriza por estrés celular y degradación de la matriz extracelular iniciada por micro y macro-lesiones que activan respuestas anómalas incluyendo la vía pro-inflamatoria de la inmunidad

innata (Kraus et al., 2015). Las citoquinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios son producidas por la sinovial y los condrocitos. Ante el estrés mecánico y los cambios en la matriz extracelular debidos al estímulo inflamatorio, los condrocitos articulares modifican su fenotipo expresando alarminas y patrones moleculares asociados a la lesión (DAMPs, del inglés "*Damage Associated Molecular Patterns*") y secretando citoquinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) e interleuquina-1 (IL-1) (Miller et al., 2014). De hecho el TNF-α y la IL-1 secretada por los condrocitos y las células sinoviales son las principales citoquinas envueltas en la progresión de la artrosis. La IL-1 estimula la producción por parte de los condrocitos de metaloproteinasas de matriz (MMP, del inglés *"Matrix Metalloproteinase"*) 1, 3 y 13 y agrecanasas suprimiendo la síntesis de proteoglicanos y de colágeno II, y promoviendo la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) (Kim et al., 2006). Por otra parte, el TNF-α tiene una acción sinérgica con la IL-1 incrementando la producción de interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8) y ligando de quimiocina 2 (CCL2, del inglés *"chemokine ligand 2"*) por parte de los macrófagos (Kapoor et al., 2011). La secreción de estas citoquinas y quimiocinas por parte de las células residentes favorece el reclutamiento en la articulación de células de la inmunidad innata como son los granulocitos y monocitos que, a su vez, secretan mediadores proinflamatorios que promueven el reclutamiento de más células inmunitarias iniciando un círculo vicioso de degradación del cartílago y afectación de la membrana sinovial que desencadena un proceso inflamatorio mantenido en el tiempo (van der Kraan, 2019). Por lo tanto, la inflamación se asocia con la progresión de la pérdida de cartílago y con los signos y síntomas de enfermedad. La sinovitis también es común en las etapas temprana y tardía de la enfermedad (Vlad et al., 2011; Sellam y Berenbaum, 2010), de hecho, la sinovitis expresada como hiperplasia sinovial e infiltrados inflamatorios de bajo grado dentro del revestimiento sinovial se observa con frecuencia en la artrosis (Robinson et al. 2016).

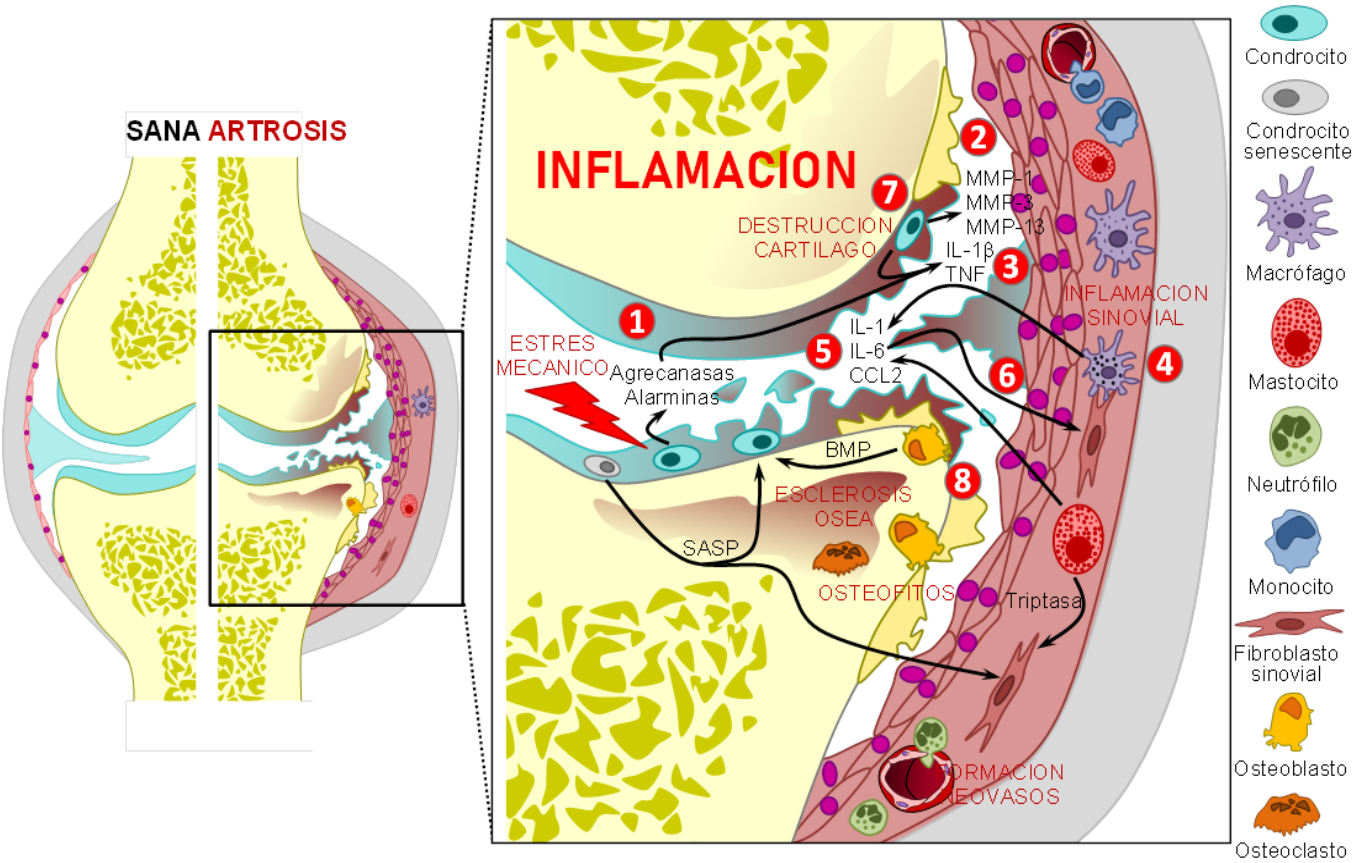


Figura 1: Fisiopatología de la artrosis en la rodilla. Ilustración realizada por el Dr. Luis Martínez Lostao

En relación con la membrana sinovial, su papel en el proceso de generación de la artrosis también resulta relevante. La membrana sinovial produce el líquido articular que lubrica y nutre al cartílago avascular, y regula la presión y la temperatura local. En la articulación sana está formada por distintos tipos de células distribuidas en 2 capas, una capa íntima superficial compuesta de uno a cuatro estratos de sinoviocitos, fibroblastos y macrófagos y una capa más profunda compuesta principalmente por tejido conectivo y vasos sanguíneos. Cuando se produce una inflamación de la articulación la capa íntima se hipertrofia entre otros motivos por el reclutamiento de células infiltrantes como neutrófilos, mastocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B de modo que su grosor puede aumentar 5-10 veces (Culemann et al., 2019). Estas células infiltrantes alteran la composición del líquido sinovial promoviendo la producción aberrante de citoquinas proinflamatorias y

productos catabólicos propios de la artrosis (Haseeb y Haqqi, 2013). En el caso de la artrosis, el infiltrado inflamatorio tiene una menor proporción de macrófagos y linfocitos T en comparación con la AR y una mayor proporción de mastocitos creando, por lo tanto, un perfil de citoquinas inflamatorias diferente al de otras patologías articulares (de Lange-Brokaar et al,. 2012; Xie et al., 2019). Por lo tanto, la inflamación presente en la artrosis y que parece tener un papel predominante en el inicio de los cambios fisiopatológicos observados en dicha patología, es diferente de la de otras patologías articulares siendo más bien crónica, de bajo grado y mediada principalmente por la inmunidad innata (Robinson et al., 2016).

MECANISMOS EFECTORES DE LAS CÉLULAS CITOTÓXICAS:

El sistema inmunatario está encargado de defender al organismo frente a distintos agentes dañinos (externos o internos). En el sistema inmunitario se pueden diferenciar dos compartimentos, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Aunque dicha distinción se realiza tradicionalmente, ambos compartimentos están estrechamente relacionados entre sí de modo que que la respuesta inmunitaria llevada a cabo por un compartimento no se puede entender sin conocer adecuadamente el otro. De hecho, la activación de la inmunidad innata no solo supone la primera línea de defensa frente al daño que desencadena la respuesta inmunitaria sino que, la forma en que se produce la activación de la respuesta innata y el contexto en el que se produce, determina en última instancia cómo se va a producir la activación posterior de la inmunidad adaptativa (Janeway, 2001)

El sistema inmune responde tanto a señales de peligro endógenas como exógenas. La visión clásica de la activación del sistema inmunitario se ha basado en la capacidad de éste de reconocer lo extraño frente a lo propio *(Self-Non-Self model)* para generar una respuesta inmunitaria adecuada. Esta visión clásica de la activación del sistema inmunitario fue avalada por la descripción de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés "*Pathogen-Associated Molecular Patterns"*) (Janeway, 1989) que son moléculas simples o patrones de estructuras muy conservadas que están presentes en muchos microorganismos pero no en

células de mamíferos. Sin embargo, a mediados de los años 90 se postuló la teoría de que el sistema inmunitario responde a señales de peligro ya sean endógenas como exógenas *(Danger model)* (Matzinger, 1994). Estas señales de peligro desencadenadas por componentes celulares que se liberan tras muerte celular o lesión, son conocidas como patrones moleculares asociados a daños *(*DAMPs, del inglés *"Damage-Associated Molecular Patterns")* (Matzinger, 2002). En cualquier caso, tanto los DAMPs como los PAMPs son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *"Pattern¨Recognition Receptors"*) (Brubaker et al., 2015), que son expresados por diferentes tipos de células inmunitarias y no inmunitarias, y que desencadenan la expresión de citoquinas proinflamatorias tales como IL-6 y TNF-α entre otras (Lamkanfi y Dixit, 2014) La producción de estas citoquinas es la responsable de la activación y la perpetuación de la respuesta inmune, incluidas los mecanismos efectores celulares y humorales, que son las responsables de eliminar al patógeno o a la célula afectada.

Entre los mecanismos efectores celulares del sistema inmunitario se encuentran las células citotóxicas. Este tipo de células son capaces de eliminar células infectadas por patógenos intracelulares, principalmente virus, y también células transformadas (Martínez-Lostao, 2015). Entre las células del sistema inmunitario con capacidad citotóxica se encuentra principalmente las células NK (del inglés *"Natural Killer")* pertenecientes a la inmunidad innata, y los linfocitos T citotócixos, pertenecientes a la inmunidad adaptativa.

Para ejercer sus funciones, las células citotóxicas utilizan 3 tipos de mecanismos comunes (Pardo et al., 2009; Martínez-Lostao et al., 2015):

1. Sistema de exocitosis granular que se basa en la degranulación de vesículas que contienen diversas proteínas citotóxicas: perforina y granzimas, y granulisina en el caso de los humanos que son capaces de inducir la muerte en la célula diana principalmente por un mecanismo de apoptosis activando la ruta apoptotica intrínseca.

2. Unión de los ligandos de muerte (FasL, Apo2L/TRAIL) a los receptores correspondientes de las células diana (Fas/CD95, DR4/DR5) que son capaces de inducir la muerte en la célula diana por un mecanismo de apoptosis activando la ruta apoptotica extrínseca.

3. Secreción de citoquinas como IFN-γ y TNF-α que aunque no tienen una acción citotóxica directa, pueden contribuir a la muerte de la célula diana favoreciendo diversos mecanismos, entre ellos, los anteriormente descritos.

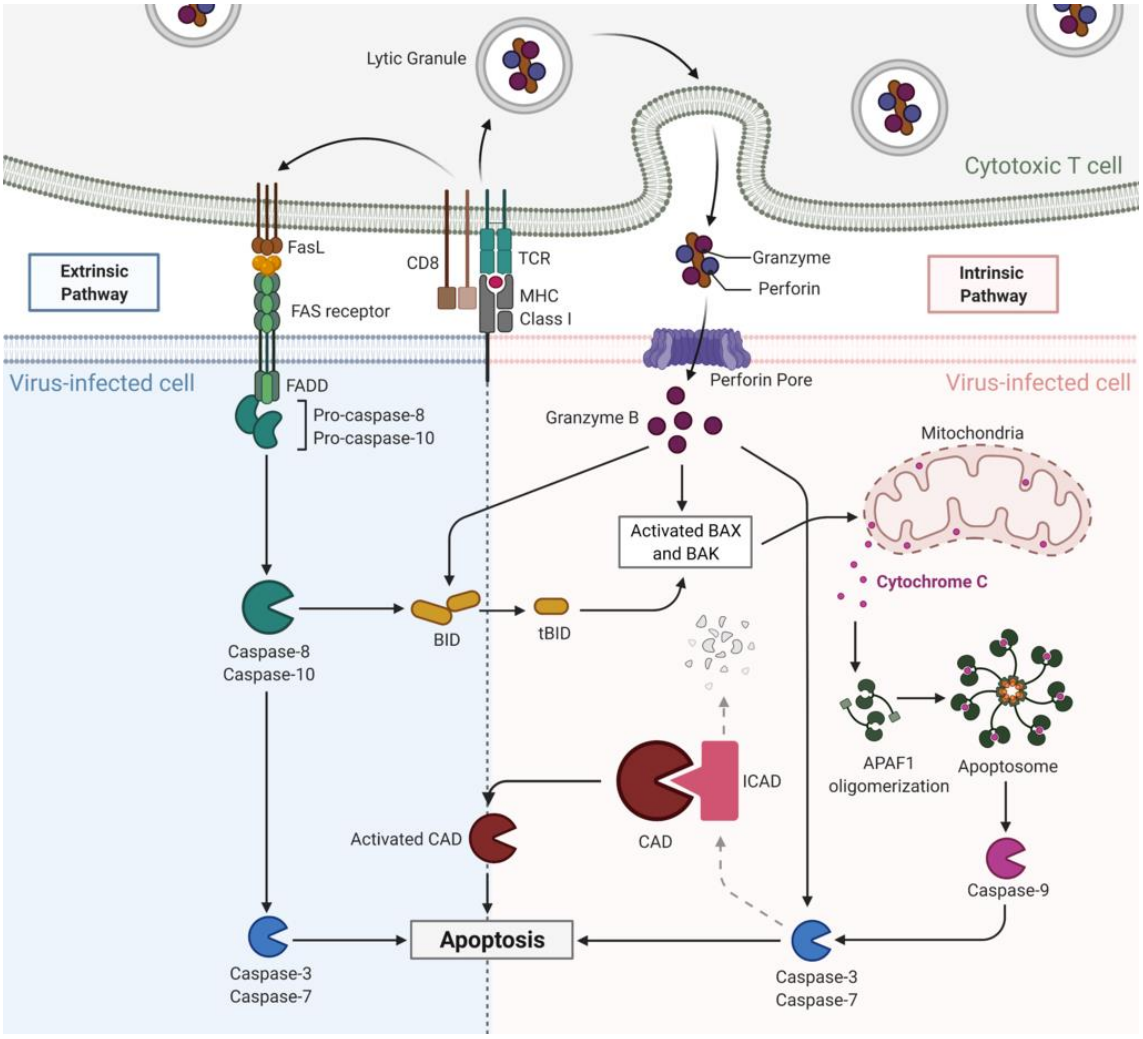


Figura 2: Mecanismos efectores células citotóxicas. Licencia CC BY-SA 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>, via Wikimedia Commons.

SISTEMAS DE EXOCITOSIS GRANULAR

Los gránulos citotóxicos presentes en las células NK y los linfocitos T citotóxicos son organelas híbridas entre lisosomas y endosomas tardíos que presentan un contenido muy variado encontrándose proteínas que solo se encuentran en estos gránulos y otras que también se encuentran en los lisosomas. A continuación se describirán brevemente los componentes de los gránulos citotóxicos principalmente implicados en su función.

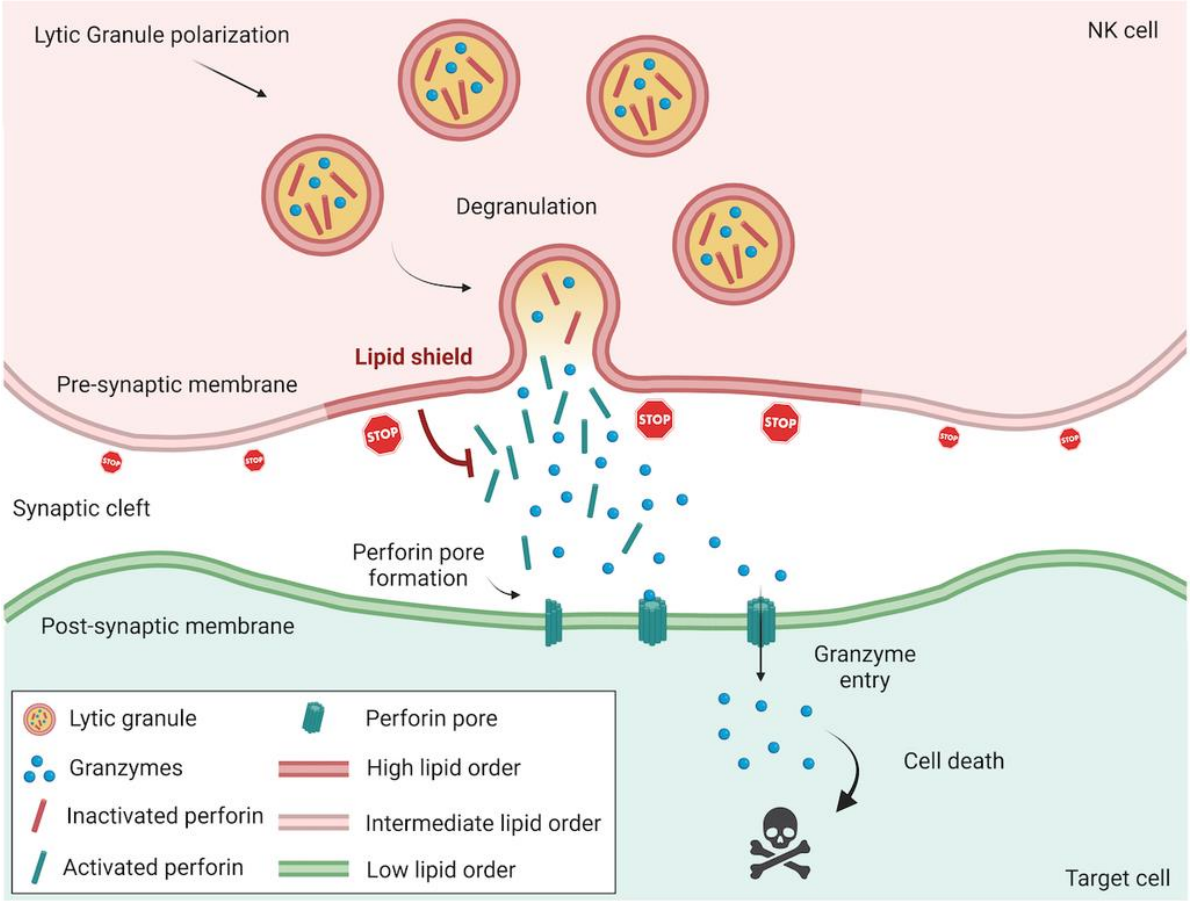


Figura 3: Sinapsis inmunológica. Tomado de Wurzer H., Filali L., Thomas C., CC BY 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, via Wikimedia Commons.

PERFORINA

La perforina (perf) es una proteína que forma poros de aproximadamente de 67 kiloDalton (KDa) y localizada en los gránulos citotóxicos de los linfocitos citotóxicos, células NK, NKT y linfocitos T y δ (Bade et al., 2005; Voskoboinik et al., 2015). La perforina es una proteína fundamental para la función de las granzimas, involucradas en la muerte celular mediada por exocitosis granular ya que se liberan conjuntamente tras formar la sinapsis inmunológica (Trapani y Smyth, 2002). La importancia de esta proteína radica en la alteración de la capacidad citotóxica de los linfocitos, ya que cuando se utilizan ratones deficientes en perf, éstos son más sensibles a desarrollar tumores e infecciones virales. (Voskoboinik et al., 2015; Bolitho et al., 2007). Estructuralmente es similar a la proteína C9 del complemento y la cual es responsable de formar los MAC (del inglés *"Membrane Attack Complex"*). Tiene una estructura formada por un dominio N-terminal que posee actividad lítica, un fragmento cuya función es desconocida, un dominio central por el que se inserta a la membrana y con forma de hélice, un dominio C2 C-terminal de unión al calcio (fundamental para su activación) y un dominio tipo EGF (Lichtenheld et al., 1988; Voskoboinik et al., 2005). La actividad de la perf está relacionada con el pH y la concentración de calcio de modo que es activa a pH neutro e inactiva con el pH ácido (Voskoboinik et al., 2005; Voskoboinik et al., 2015). El pH ácido, las concentraciones bajas de Ca^{2+} y su unión a la calreticulina mantienen la perf inactiva dentro de los gránulos (Fraser et al., 2000). Cuando se libera el contenido de los gránulos al espacio extracelular, desaparece su unión a la calreticulina y entonces puede ejercer su acción de forma libre (Andrin et al., 1998). La perf solo es capaz de permitir la muerte celular a altas concentraciones y lo hace permitiendo la entrada de las granzimas en el interior de las células diana, siendo estas las responsables de producir la inflamación o muerte celular (Duke et al., 1989).

Por otra parte, existen mecanismos diversos de protección de los linfocitos frente a la perf entre los que se encuentra la catepsina B, el marcador lisosomal CD107a (Lamp1) y la serpina B9 (inhibidor de granzima B) (Balaji et al., 2002; Baran et al., 2006; Bird et al., 1998)

Históricamente se han planteado diversos modelos para intentar explicar el mecanismo de acción de la perf, sin embargo, en los últimos años, los trabajos sugieren que la perf forma directamente poros en la membrana plasmática y de este modo permite el paso de las granzimas al interior de las células diana (Law et al., 2010; Metkar et al., 2011; Metkar et al., 2015; Voskoboinik et al., 2015).

GRANZIMAS

Las granzimas (gzms) son una familia de serinproteasas descubiertas en los años 80 (Masson y Tschopp, 1987; Simon et al., 1987). Hasta la fecha, 5 tipos de granzima han sido descritas en humanos (A,B,H,K y M) y 10 en ratones (A,B,C,D,E,F,G,K,M y N), siendo la granzima A (gzmA) y la granzima B (gzmB) las más abundantes y las mejor caracterizadas (Pardo et al., 2009). Estas proteasas son principalmente expresadas por los linfocitos T CD8+ y las células natural killer (NK) (Koizumi et al., 1991; Hirst et al., 2001; Grossman et al., 2004; Hernandez-Pigeon et al., 2006; Pardo et al., 2007). También han sido detectadas en linfocitos T γ δ, linfocitos T CD4+ , células T reguladoras, macrófagos, basófilos, mastocitos, espermatozoides, células de Sertoli, queratinocitos, neumocitos, macrófagos alveolares y células epiteliales alveolares (Arias et al., 2017).

Las granzimas se sintetizan como zimógenos inactivos y ya en los gránulos, después de eliminar el péptido señal, maduran por acción de la captepsina C, que elimina 2 aminoácidos del extremo N-terminal (McGuire et al., 1993). Dentro de las vesículas, por acción del pH ácido, se mantienen inactivas y cuando se liberan al espacio extracelular adquieren capacidad proteolítica (Trapani, 2001).

Inicialmente, se demostró que la función fundamental de las granzimas era inducir la muerte celular por apoptosis en las células transformadas o infectadas. Recientemente, se ha descubierto que las granzimas juegan un papel importante en otros procesos tales como la regulación de la respuesta inflamatoria. Además, juegan un papel importante en la inactivación de virus, modificación de la matriz extracelular o el control de linfocitos activados (Arias et al., 2017, Hiebert et al., 2011, Martinez-Lostao et al., 2015, Pardo et al 2009, Wensink et al., 2015).

Sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que las granzimas juegan un rol importante en otros procesos biológicos.

GRANZIMA A

La granzima A (gzmA) presenta actividad triptasa, siendo la proteasa más abundante. Es secretada en forma de dímero (Froelich et al., 2009).

Aunque su capacidad citotóxica ha sido demostrada in vitro mediante diversos modelos heterólogos, los últimos hallazgos indican que la gzmA juega un rol principalmente como proteasa pro-inflamatoria. Tanto la gzmA pura como la gzmA que expresan las células citotóxicas inducen la liberación de interleuquina 1-beta (IL-1β), interleuquina 6 (IL-6) y TNF-α en los macrófagos humanos y de ratón (Metkar et al., 2008). Otros estudios han demostrado que la gzmA induce la producción de IL-6 e interleuquina 8 (IL-8) por parte los fibroblastos y de IL-8 por las células epiteliales (Sower et al., 1996). Sin embargo, los mecanismos moleculares asociados a la función inflamatoria de gzmA son todavía desconocidos.

Las evidencias experimentales que se han obtenido en los últimos años indican que las granzimas pueden tener una actividad extracelular independiente de la perforina y que podrían estar involucradas en los procesos inflamatorios subyacentes al envejecimiento, ateroesclerosis y artritis reumatoide (Arias et al., 2017). De hecho un incremento en los niveles de gzmA, gzmB y gzmK extracelular ha sido observado en diversos fluidos biológicos de pacientes afectos de diversas patologías inflamatorias y autoinmunes como la artritis reumatoide (Bratke et al., 2004; Granville, 2010; Hendel et al., 2010; Hiebert y Granville, 2012; Lauw et al., 2000; Tak et al., 1999). Nuestro grupo ha demostrado que gzmA induce osteoclastogénesis a través de un mecanismo dependiente de TNF-α y, utilizando un modelo de artritis reumatoide inducida por colágeno, ha observado que los ratones que tienen deficiencia en gzmA mostraban un grado menos severo de la enfermedad (Santiago et al., 2016). Otros grupos han demostrado que los ratones con deficiencia en gzmA presentan una artritis menos severa en un modelo murino de artritis inducida por el virus Chikungunya (Wilson et al., 2017).

Niveles elevados de gzmA también han sido detectados en diversas enfermedades infecciosas como el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH), virus Epstein-Barr (VEB) o en infecciones por Plasmodium Falciparum (Hermsen et al., 2003; Wensink et al., 2015).

Nuestro grupo también ha estudiado la implicación de gzmA en la infección por Micobacterium Tuberculosis detectando un incremento de expresión de la misma en células NK y linfocitos a nivel pulmonar pero sin obsevarse un efecto protector puesto que los ratones con deficiencia de gzmA mostraban una infección y supervivencia similar a los controles (Uranga et al., 2016).

GzmA también ha sido relacionada con procesos de endotoxemia, sepsis (encontrándose niveles elevados), proteolisis de la matriz extracelular o muerte celular por anoikis (Simon et al., 1991; Yoshikawa et al., 2008; Lauw et al., 2000).

GRANZIMA B

La granzima B (gzmB) es una proteasa que es importante para inducir la apoptosis mediada por las células citotóxicas (Heusel et., 1994) y lo hace gracias a la activación directa de las caspasas (Pardo et al., 2008) o mediante la vía mitocondrial apoptótica (Sutton et al., 2000; Goping et al., 2003; Pardo et al., 2008). Además es capaz de inducir muerte por anoikis (un tipo particular de apotosis de las células epiteliales y endoteliales), degradando algunos componentes de la matriz extracelular tales como la laminina, vitronectina y fibronectina y produciendo en última instancia que las células se despeguen de la matriz y mueran (Buzza et al., 2005; Pardo et al., 2007)

Aunque es ampliamente aceptado que la gzmB es eminentemente citotóxica y, junto con la perforina, induce apoptosis en células infectadas o cancerosas (Arias et al., 2017; Garzon-Tituana et al., 2020; Martinez-Lostao et al., 2015) estudios experimentales recientes evidencian que tanto *in vitro* como *in vivo* el potencial citotóxico es muy limitado (Joeckel y Bird, 2014) estando envueltas en otros procesos no relacionados con la citotoxicidad celular tales como la regulación de la respuesta inflamatoria, la inactivación de virus, la modificación de la matriz extracelular y la regulación de los linfocitos activados (Metkar et al., 2008; Pardo et al.,

2009; Martinez-Lostao et al., 2015; Wensink et al., 2015; Arias et al. 2017; Garzon-Tituana et al., 2020).

Niveles elevados de gzmB se han detectado en el suero de pacientes que presentan enfermedades inflamatorias como la AR y el asma. Estos hallazgos sugieren que gzmB podría tener funciones extracelulares en relación con procesos inflamatorios (Afonina et al., 2010). Asimismo también se ha detectado gzmB en los basófilos de pacientes con asma (Tschopp et al., 2006).

Además de lo descrito con anterioridad, gzmB ha sido relacionada con multitud de procesos. Algunos de éstos son:

- Heridas crónicas.
- Envejecimiento de la piel, donde participa en la degradación de proteínas de la reparación tisular y la coagulación.
- Degradación de sustratos como el factor von Willebrand o fibrinógeno (Buzza et al., 2008).
- Proteólisis de fibronectina, vitronectina y decorina, relacionadas con la reparación tisular (Hiebert et al., 2011).
- Arterioesclerosis y aneurismas actuando sobre algunos componentes de la matrix extracelular tales como fibrilina-1, produciendo alteraciones e inestabilidad en la pared vascular (Hendel et al., 2014).
- En procesos de sepsis, ya que se ha descrito que gzmB sería capaz de degradar la cadherina vascular endotelial produciendo pérdida de la función de barrera del endotelio favoreciendo la hipotensión (Shen et al., 2016; Peters et al., 2003). También se han encontrado niveles elevados en plasma de gzmB en pacientes con sepsis (Lauw et al., 2000).
- Progresión de tumores, al descubrirse que algunos tipos celulares con funciones tumorales sobreexpresan gzmB.
- Efectos antivirales, puesto que se ha visto como además inducir la apoptosis en células infectadas puede inhibir replicación de ciertos virus actuando sobre ciertas proteínas (Andrade et al., 2007; Andrade, 2010)

OTRAS GRANZIMAS CON PROPIEDADES PROINFLAMATORIAS

Otras granzimas, como granzima K (gzmK) y granzima M (gzmM) también han sido relacionadas con procesos inflamatorios.

La gzmK es una serin proteasa con actividad triptasa, siendo descrita su actividad proinflamatoria recientemente. La gzmK es capaz de inducir inflamación en diferentes tipos celulares e inducir la producción de IL-6, IL-8 y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1) en fibroblastos pulmonares humanos, a través de un mecanismo que depende de la activación del receptor PAR-1 (del inglés, *"protease-activated receptor 1"*) (Joeckel et al., 2011; Cooper et al., 2011). Asimismo, se ha observado que gzmK recombinante activa induce la producción de IL-1β en macrófagos del peritoneo que han sido pre-estimulados con lipopolisacáridos (LPS) (Joeckel et al., 2011).

En los últimos años se ha visto que la gzmK humana potenciaría la liberación inducida por LPS de TNF-α, IL-6 e IL-8 en los monocitos humanos y que dicho efecto no necesita de la actividad proteolítica de la proteasa. El mecanismo sugerido para poder explicar dicha sinergia es que gzmK estimularía la formación del complejo entre LPS y CD14 liberando moléculas individuales de LPS a partir de las micelas (Wensink et al., 2014).

También se ha visto un incremento de los niveles plasmáticos de gzmK en pacientes con sepsis (Rucevic et al., 2007). Estos datos junto con las propiedades proinflamatorias descritas para dicha proteasa, sugieren que la gzmK puede jugar un papel relevante en la sepsis.

En cuanto a gzmM, se trata de una serin proteasa que expresada principalmente en células NK, NKT y linfocitos Tγδ (Krenacs et al., 2003).

Existen estudios que indican que la gzmM podría tener un papel regulador importante en la liberación de citoquinas en las infecciones por bacterias Gram+ y Gram- aunque el mecanismo por el que dicha granzima induce efectos inflamatorios no ha sido descrito (Anthony et al., 2010). Al utilizar ratones *"knockout"* (KO) en gzmM se ha observado que tras la administración de LPS, los niveles en el suero de citoquinas proinflamatorias como IL-1α, IL-1β, TNF-α e IFNγ son menores si los comparamos con los controles (Anthony et al., 2010). Esto significaría que la gzmM participa

regulando de la producción de dichas citoquinas cuando se produce la infección por bacterias gram-

En el mismo estudio se observó que los ratones KO en perf tenían un perfil de citoquinas parecido a los KO en gzmM. Esto podría evidenciar una función intracelular de dicha proteasa. También pudo observarse que los ratones KO en gzmA y gzmM tenían más resistencia a la endotoxemia inducida por LPS que los KO simples. Esto parece indicar que los mecanismos de acción de las gzmM y gzmA en respuesta al LPS son distintos (Anthony et al., 2010). Por otra parte, se ha visto que que la gzmM *in vitro*, no es capaz de cortar a la pro-IL-1β (Anthony et al., 2010), a diferencia de la gzmA.

También se ha visto que la ausencia de gzmM, disminuye la producción de MIP-1α en células NK y macrófagos aislados en el hígado de ratones que han sido tratados mediante LPS o infectados con la bacteria Gram+ Listeria monocytogenes. Los ratones KO en gzmM mostraron una mayor supervivencia que los controles en la infección por Listeria monocytogenes (Baschuk et al., 2014).

En resumen, la inflamación parece que juega un papel crucial en la fisiopatología de la artrosis y, especialmente gzmA y gzmB, han sido identificados en otras patologías articulares.

MODELOS DE ARTROSIS EN EL RATÓN

La rotura del ligamento cruzado anterior altera la biomecánica y la estabilidad articular conduciendo al desarrollo de artrosis en 10-15 años en humanos (Jakobsen, 1977; Ross et al., 1995).

Los modelos de inestabilidad quirúrgica son los modelos más comunes de artrosis en el animal de laboratorio y están ampliamente aceptados en perros, cerdos de guinea, conejos, ratas, ovejas y cabras. Las ventajas de los modelos quirúrgicos sobre los modelos espontáneos incluyen un desarrollo más rápido de la enfermedad, menos variabilidad y una menor dependencia de factores genéticos (Brandt et al., 1991; Oegema y Visco, 1999).

Debido al alto coste que supone el cuidado y mantenimiento de especies de gran tamaño, se prefieren modelos con animales más pequeños como forma de *"screening"* preliminar. Los animales transgénicos, entre ellos el ratón, permiten el estudio de animales que presentan deleciones o sobreexpresión de determinados genes. Estas características hacen del ratón la especie preferida para caracterizar el significado *in vivo* de un gen en particular. Los modelos de roedores se utilizan ampliamente debido a la homogeneidad del fondo genético y la facilidad de manejo. Otro beneficio del uso de modelos animales es la posibilidad de modificar selectivamente el genoma de estos y generar cepas KO para genes específicos (Di Paola y Cuzzocrea, 2008). Entre las desventajas para el uso de ratones transgénicos incluyen los largos tiempos para producir estos ejemplares y los altos costes. A pesar de estas limitaciones conocidas, el potencial para identificar enzimas clave en animales transgénicos hace que la evaluación de modelos de artrosis en ratones sea particularmente atractiva.

Los modelos de inestabilidad utilizados antes del desarrollo de las técnicas microquirúrgicas incluyen el modelo de inyección intraarticular de colagenasa y un método cerrado utilizando una aguja de calibre 25 para seccionar los ligamentos cruzados (Moilanen et al., 2002).

La *utilización de la aguja de calibre 25* tiene la limitación de que produce una iatrogenia variable, sangrado intraarticular y variabilidad en cuanto a la sección de uno o ambos ligamentos cruzados.

La *inyección de colagenasa* ha sido ampliamente utilizada en modelos de inestabilidad durante muchos. El daño sobre el cartílago mediante la lisis del colágeno tipo II es teóricamente posible con dosis suprafisiológicas que son utilizadas como bolos. Sin embargo, la colagenasa bacteriana se muestra ineficaz para escindir el colágeno tipo II y existe una gran variabilidad en dicho modelo en cuanto a diferentes grados de destrucción ligamentosa, afectación variable de uno o más ligamentos de la rodilla y variabilidad en cuanto a los tiempos en los que se produce la destrucción y el desarrollo de la artrosis (van Osch et al., 1993; van der Kraan et al., 1990). Además de esto, el modelo de la colagenasa, se asocia a condrogénesis de los ligamentos colaterales con formación ósea progresiva más importante a nivel medial que a nivel lateral. La luxación de la rótula también se ha descrito en este modelo y su contribución al desarrollo de artrosis en modelos murinos es desconocida (van der Kraan et., 1989).

Los *modelos espontáneos* de artrosis en ratón se desarrollan durante largos períodos de tiempo como en la artrosis humana idiopática. Cruzar un ratón KO con una cepa con una predisposición genética a la artrosis lleva de 6 a 10 generaciones. Esto puede tardar hasta 2 años, con otros 6 meses a 1 año para envejecer a los ratones antes de que los efectos puedan ser evaluados. Además se requiere un gran número de ratones para el estudio puesto que la inducción de artrosis en este modelo es muy variable. Estos factores hacen que los modelos espontáneos sean menos atractivos para la evaluación inicial de objetivos y estudios de inhibidores (Masson et al., 2001; Glasson et al., 1996).

El primer modelo quirúrgico de artrosis descrito en el ratón fue la meniscectomía medial parcial (MMP) junto con la sección del ligamento colateral medial (LCMS) desarrollado por Visco y colaboradores en 1996 (Visco et al., 1996). Este modelo fue utilizado para evaluar la IL-1β, MMP-3 (Stomelisin-1), la enzima convertidora de interleuquina-1 y la sintasa inductible de óxido nítrico (iNOS) en ratones KO. Sorprendentemente, la enfermedad no fue derogada en ninguno de estos ratones KO y se observó una artrosis mucho más severa en las extremidades contralaterales de los IL-1β KO. Este resultado podría indicar que otras vías catabólicas estaban sobre-reguladas (Clements et al., 2003), que se producía un aumento de la carga en la extremidad no operada, o que los modelos o los sistemas de

puntuación no eran del todo apropiados. En otro laboratorio, la desestabilización del menisco medial (DMM) en ratones KO MMP-3 e IL-1β no produjeron diferencias entre MMP-3 y controles –wt-, mientras que el KO de IL-1β fue significativamente protegido a las 4 y 8 semanas (Glasson et al., 2005). Este resultado puede apoyar la hipótesis de Visco y colaboradores (1996) de que la inestabilidad mecánica creada en el modelo MMP + LCMS puede ser demasiado severa, y también puede verse afectado por las diferencias en el corte histológico y la puntuación entre los dos laboratorios.

Kamekura y colaboradores (Kamekura et al., 2005) describieron 4 modelos de inducción de artrosis que incluyen la sección del ligamento cruzado anterior (ACLT) +/- meniscectomía completa medial (MM) +/- sección del ligamento cruzado posterior (LCP) y del rotuliano así como MM +/- sección del ligamento colateral medial. La erosión ósea subcondral del platillo tibial posterior (en algunos casos alcanzando la placa de crecimiento) fue demostrada en los cortes histológicos de las cirugías de ACLT combinadas, similar a las observaciones de las cirugías de ACTL aisladas de Glasson y colaboradores (Glasson et al., 2007). Cambios histológicos menos severos para su modelo de ACLT aislado fueron observados en comparación con el estudio de Glasson y colaboradores (2007) y pueden reflejar las diferencias en la técnica quirúrgica, las cepas de ratones utilizados (C57/Bl6 en comparación con 129S6/SvEv), diferentes sistemas de puntuación y diferencias en los cortes histológicos.

En ambos laboratorios, se observó una falta de inflamación de la membrama sinovial tras la cirugía. El estudio de Glasson difiere en algunos aspectos del de Kamekura al realizar la comparación del modelo ACLT con el modelo DMM por ejemplo al proporcionar diferentes fotografías/cortes que detallan la ubicación anatómica precisa para la sección del ligamento. En cuanto a la evaluación histológica del modelo ACLT, también es diferente, con incorporación de todos los "*scores*" de los cuatro cuadrantes articulares utilizando secciones frontales en el caso del estudio de Glasson. Kamakura utilizó secciones frontales para el modelo medial, y secciones sagitales del lado medial de la articulación (sin analizar el lado lateral), para los otros modelos restantes. Esta diferencia en el corte hace que sea imposible cegar al grupo modelo medial. Al evaluar otros modelos o transgénicos, no se

puede suponer que la zona de daño articular quede restringida al lado medial de la articulación, ya que la cirugía DMM en el ratón transgénico que sobreexpresa hMMP-13 produce también la destrucción máxima del cartílago en el lado lateral.

En el estudio de Glasson y colaboradores del 2007, el modelo ACTL en su laboratorio, produjo mínima artrosis a nivel anterior de la articulación con moderada-severa artrosis en la zona de carga central (Glasson et al., 2007). Las lesiones producidas tras la cirugía ACTL fueron a menudo severas en la zona más posterior del platillo tibial, debido al cajón anterior del platillo tibial en relación con los cóndilos femorales. El incremento de la carga en la zona posterior del platillo tibial resultó en la destrucción del cartílago y la erosión ósea subcondral a nivel de la placa de crecimiento en el 30% de las rodillas en 8 semanas. La erosión subcondral puede permitir la aparición de médula ósea y células sanguíneas dentro de la cavidad sinovial. El sangrado articular es un factor de riesgo conocido para la artrosis en pacientes con hemofilia (Roosendaal et al., 2003) y la sangre libre en rodillas murinas también puede contribuir a una mayor progresión de la artrosis. La integridad del ligamento cruzado posterior (LCP) se confirmó en el 95% de las articulaciones en el estudio ACTL confirmando la precisión del método de Glasson y colaboradores de seccionar un solo ligamento. El impacto de la condrogénesis y la formación de hueso ectópico en la estabilidad articular es desconocido y es posible que la anquilosis pueda ocurrir más tarde en el modelo ACTL. La experiencia con el modelo ACTL de Glasson y colaboradores muestra diferencias puesto que inicialmente observaron una artrosis mucho más severa con mayor condrogénesis y erosión ósea subcondral que actualmente, lo que atribuyen a mejoras en el instrumental y la técnica quirúrgica. La calidad de los cortes histológicos y la profundidad de los mismos les han permitido una mejor visualización de las muestras y del LCA. Las incisiones se han vuelto cada vez más pequeñas disminuyendo el daño en el cartílago y el sangrado articular. Es posible que la sección del LCP ocurriera en los estudios iniciales por la peor visualización de las estructuras y esto pudo significar un mayor desarrollo de artrosis. Es por eso que recomiendan que los grupos que desarrollan este tipo de experimentos lo hagan utilizando material

microquirúrgico y habiendo practicado y entrenado dichas técnicas, especialmente para el modelo ACTL.

DESESTABILIZACIÓN QUIRÚRGICA DEL MENISCO MEDIAL (DMM)

En el año 2007, Glasson y colaboradores realizan un estudio comparando dos modelos de inducción de artrosis en el ratón (Glasson et al., 2007).

Dado que el modelo de sección del LCA produce una artrosis severa y mucha variabilidad en cuando a las lesiones producidas así como iatrogenia, comparan el uso dicho modelo con la desestabilización del menisco medial (DMM) mediante la sección del ligamento menisco medial (LMM). El modelo DMM se selecciona basándose en estudios no publicados en cerdos guineanos donde se observa desarrollo de artrosis con gran facilidad y reproductibilidad. Se compara el grado de artrosis para ambos modelos con el objetivo de identificar un modelo que desarrolle artrosis de forma leve a moderada, en el que los efectos de la modificación genética (por ejemplo, deleción de determinadas enzimas) no estén sobreestimados ni influenciados por el daño ni por los cambios biomecánicos inducidos por otros modelos de artrosis más severa. Estos modelos de artrosis más severa se asocian a mayor iatrogenia, variabilidad, mayores cambios biomecánicos y cambios regenerativos como la formación de osteofitos hasta producir anquilosis, lo que puede alterar el posterior estudio del grado de degradación del cartílago. La hipótesis es que el modelo DMM tiene buena reproductibilidad con menor progreso de la enfermedad y por lo tanto tendría gran utilidad en ratones con deleciones enzimáticas.

Así pues, tras la aprobación del comité de ética correspondiente, utilizan ratones KO incluyendo ratones KO para ADAMTS-4 y ADAMTS-5. Los grupos para DMM y ACLT tienen al menos 10 animales por grupo con al menos 6 animales por grupo en los grupos placebo y no intervenidos. Los animales están almacenados en grupos de 5 por caja y con acceso libre a comida y bebida. Son anestesiados con 300mg/kg de tribromoetanol intraperitoneal y la cirugía es llevada a cabo de forma aséptica. El instrumental utilizado incluye un microscopio tipo Leica LZ-6 y material de microcirugía.

El ligamento menisco medial (LMM) ancla el menisco medial (MM) al platillo tibial mientras el LCA impide a la tibia la traslación anterior en relación con el fémur.

El abordaje quirúrgico es similar para ambos modelos con una incisión longitudinal de unos 3mm sobre la parte distal de la patela hacia la parte proximal del platillo tibial. La capsula articular se incide inmediatamente medial al tendón rotuliano y se abre la articulación con tijeras microquirúrgicas. Se lleva a cabo una disección de la grasa que recubre la zona intercondilar para exponer dicha región y visualizar el LCA o el LMM del menisco medial. Se controla la hemorragia de la zona grasa aplicando compresión y utilizando esponjas absorbentes.

El LCA se origina en la zona posterolateral del área intercondilea femoral y se inserta anteriormente a nivel central del platillo tibial, en las espinas tibiales. El LCA es lateral al ligamento cruzado posterior que raramente se visualiza utilizando este abordaje. En el modelo de sección del LCA se luxa la patela para una mejor exposición de la articulación femorotibial. Con la patela luxada, el cartílago se mantiene humedecido con solución salina. Se procede a la sección del LCA con instrumental microquirúrgico bajo visualización directa, evitando lesionar en LCP, y se confirma por la presencia de cajón anterior.

En cuanto al modelo DMM, el ligamento menisco medial ancla el MM al platillo tibial como se ha mencionado previamente. La grasa alrededor del cuerno anterior del menisco medial se retira. El LMM se identifica porque sigue el trayecto desde el cuerno anterior del menisco medial lateralmente hacia el platillo tibial. Se debe identificar y proteger el ligamento meniscotibial lateral (LMTL) que se encuentra ligeramente posterior y cercano al LMM. Ocasionalmente existe una banda entre ambos ligamentos y solo en estos casos debe ser seccionada. Se procede a la sección del LMM mediante el instrumental microquirúrgico lo cual crea inestabilidad al MM. Con el MM intacto existe una gran congruencia y área de contacto entre las estructuras articulares con una región amplia para transmitir las fuerzas de carga. Tras llevar a cabo la sección del LMM, se produce el desplazamiento medial del MM por lo que la carga se transmite a un área mucho más pequeña produciendo un incremento del estrés local. Cuando la rodilla del ratón se encuentra fija durante la carga, esto produce un mayor estrés en la

zona posterior femoral y central tibial en el lado medial de forma predominante.

Los ratones control incluyen cirugía sin sección ligamentosa para visualizar únicamente las estructuras articulares.

Tras la cirugía se procede al cierre de la cápsula (Vicryl 8-0), tejido subcutáneo (Vicryl 7-0) y piel (adhesivo tisular).

Tras esto el grupo de Glasson (Glasson et al., 2007) procede a la eutanasia de los ratones con dióxido de carbono a las 4 y 8 semanas postoperatorias y las rodillas son fijadas en paraformaldehido 4% durante 24h. Toda la articulación es decalcificada en EDTA durante 6 días en un vibrador. Las articulaciones completas son embebidas en parafina y se realizan secciones de 6 micras a lo largo de toda la articulación en intervalos de 80 micras. Las muestras se tiñen con O-safranina, hematoxilina-eosina, verde rápido y tinción tricromática de Masson
Cada rodilla tiene unas 13-16 muestras para puntuar por dos observadores ciegos utilizando la siguiente escala (Glasson et al., 2007) que elimina el grado 4:

0: representa el cartílago normal.

0,5: representa la pérdida de O-Safranina sin daños estructurales.

1: superficie articular rugosa y pequeñas fibrilaciones.

2: fibrilación en la lámina superficial y ligera pérdida de la lámina.

3: fibrilaciones que se extienden al cartílago calcificado menos del 20% de espesor.

5: fibrilaciones y erosiones que alcanzan del 20 a 80% de espesor del cartílago.

6: erosión del cartílago superior al 80%.

Se procede a un análisis ciego de los cuatro cuadrantes articulares: cóndilos femorales medial y lateral y platillos tibiales medial y lateral y al posterior análisis estadístico de los datos obtenidos.

Además se evalúa la sección de los ligamentos, la aparición de condrogénesis, la luxación patelar y la formación de hueso ectópico y de osteofitos.

Los resultados obtenidos en dicho estudio (Glasson et al., 2007) muestran como el módelo DMM muestra más artrosis que los controles y un incremento de artrosis entre las 4 y 8 semanas de forma estadísticamente significativa. Esto representa una progresión de artrosis leve/moderada a moderada. La artrosis más severa aparece en el modelo de sección del LCA donde aparecen las puntuaciones máximas pero sin diferencias estadísticamente significativas en comparación con el modelo DMM.

En el modelo DMM no se observa condrogénesis, luxación patelar, células libres en la cavidad sinovial y formación de hueso ectópico. Las lesiones son más apreciables a nivel del lado medial articular tanto a nivel femoral como tibial aunque ligeramente más común a nivel anterocentral en la tibia.

En el modelo de sección del LCA, se observa en un 30% destrucción de la parte posterior del platillo tibial a través el hueso subcondral a las 8 semanas. No se observa a las 4 semanas. En estas rodillas con destrucción ósea subcrondral aparecen células libres en la cavidad sinovial. También aparece condrogénesis y depósito de proteoglicanos tanto a nivel medial como lateral. La formación de hueso ectópico no presente en la zona medial a las 4 semanas, aparece en un 40 % a las 8 semanas. No se observa luxación patelar y la integridad del LCP se confirma en 19/20 rodillas.

Parece claro por tanto que el modelo de sección del LCA produce una artrosis mucho más severa que el modelo DMM, siendo este último un buen modelo para estudio de artrosis en ratón con lesiones mucho menos severas que el modelo de sección del LCA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Se ha demostrado que la inflamación juega un papel clave en la fisiopatología de la artrosis y que contribuye tanto al desarrollo de la enfemedad como a la sintomatología por lo que se plantea este trabajo de investigación con la siguiente hipótesis:

Si la granzima A desempeña un papel como proteasa pro-inflamatoria y provoca la liberación de mediadores inflamatorios implicados en el progreso de la artrosis, los niveles elevados de granzima B han sido asociados con enfermedades inflamatorias crónicas con afectación articular y la perforina está vinculada a la acción de la granzima B; la carencia de la capacidad para producir granzima A, granzima B o perforina en ratones seleccionados genéticamente por su incapacidad para producir granzima A, granzima B o perforina, podría atenuar el desarrollo de la artrosis de rodilla en un modelo experimental de artrosis mediante desestabilización del menisco medial (DMM).

Por lo tanto los objetivos del trabajo son:

Principal: Valorar el efecto de la carencia de gzmA, gzmB y perf en el desarrollo de la artrosis en un modelo quirúrgico de inducción de artrosis en ratones.

Secundario: Valorar la implicación del factor sexo del animal en el desarrollo de dicha patología.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

En todos los experimentos se siguieron protocolos de experimentación animal establecidos, actualizados y aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal (CEA) de la Universidad de Zaragoza. Se solicitó la valoración por dicha comisión de dos procedimientos de inducción de artrosis en ratón. Dichos procedimientos consistían en los modelos de sección del LCA y el modelo DMM. Se aprobó el módelo DMM por ser de menor iatrogenia para los animales.

Los animales utilizados en los procedimientos quirúrgicos fueron los siguientes:

Animales control (wild type –wt-)

• Con un trasfondo genético C57BL/6 (B6) (Harlan Laboratories) o de la colonia estable mantenida en el animalario del CIBA. Fueron clasificados como Grupo C.

*Animales Knock-out (*KO*)*

• Ratones KO: gzmA$^{-/-}$ (KO de gzmA), gzmB$^{-/-}$ (KO de gzmB), y perf$^{-/-}$ (KO de perf). Estos animales fueron proporcionados por el Dr. Markus Simon del Instituto Max-Planck de Inmunobiología y Epigenética, Friburgo, Alemania y mantenidos en el animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). Todos estos ratones tienen un fondo genético C57BL/6. Fueron clasificados como grupo A, B y P respectivamente.

Todos los animales se mantuvieron en ambiente libre de patógenos, con alimentación y agua "ad libitum" y se utilizaron a una edad de 8-9 semanas. El genotipo de todas las cepas de ratones se analizó periódicamente por PCR, como se ha descrito previamente (Arias et al., 2014)

Se utilizaron un total de 75 ratones machos y hembra en nuestro experimento. Del total de 75 ratones, 40 de ellos eran hembras (11 gzmA$^{-/-}$ 9 gzmB$^{-/-}$, 10 perf$^{-/-}$ y 10 –wt-) y 35 eran ratones macho (8 gzmA$^{-/-}$, 8 gzmB$^{-/-}$, 9 perf$^{-/-}$ y 10 –wt-).

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Para mantener el anonimato de cada animal se asignaron códigos numéricos a cada individuo y rodilla intervenida. Se llevó a cabo la inducción de artrosis en los ratones mediante el modelo DMM descrito previamente (Glasson et al., 2007).

En cuanto al procedimiento, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de isofluorano 2 % en oxígeno (Figura 4 y 5). Después de desinfectar y preparar la piel con povidona yodada se realizó una incisión milimétrica longitudinal en la rodilla derecha donde se llevó a cabo la inestabilización del LMM mediante material de microcirugía (Figura 6A Y 6B). Seguidamente se suturó la piel con sutura no absorbible 3.0 y se le administró una dosis subcutánea de 0,05 mg/kg de buprenorfina en 1 ml de cloruro de sodio (Figura 7). En el lado izquierdo se realizó cirugía placebo llevando a cabo únicamente el acceso articular mediante sección capsular sin lesionar el LMM y se suturaron posteriomente la cápsula y la piel.

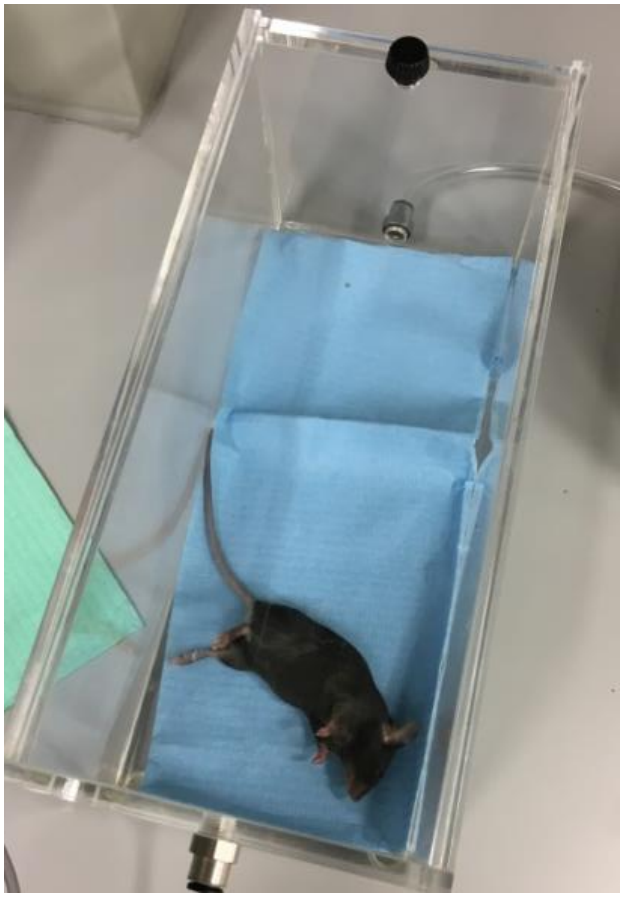


Figura 4: Ratón anestesiado en cámara de gas con isofluorano 2%.

Figura 5: Colocación del animal en mesa quirúrgica. Se utilizó Lubrithal para la humectación ocular y prevención del ojo seco durante el procedimiento.

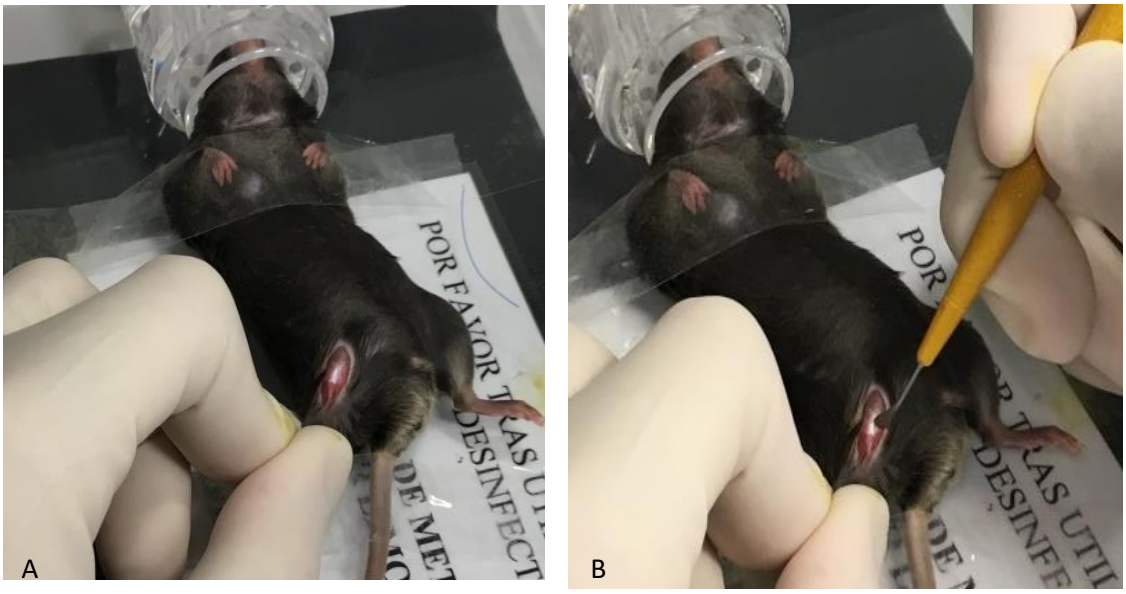


Figura 6: Abordaje quirúrgico de rodilla derecha (A) y sección del LMM (B).

Figura 7: Cierre de incisión quirúrgica mediante sutura no reabsorbible de 3/0. Rodilla derecha.

En un plazo aproximado de 8 semanas tras realizar la intervención quirúrgica se procedió al sacrificio de los ratones en cámara de CO2, mediante liberación paulatina del gas. Se les retiró asépticamente la rodilla derecha intervenida y la rodilla izquierda con una sección a nivel de tercio distal de fémur y a nivel de tercio proximal de tibia y peroné eliminando la musculatura y tejidos blandos a excepción del espacio articular (Figura 8A Y 8B). Las muestras se introdujeron en casettes los cuales contaban con un código alfanumérico que permitía identificar el ratón intervenido y el lado. Asimismo se orientaron el plano frontal/coronal colocando la rodilla hacia arriba para facilitar el posterior procesado de las muestras y el análisis histopatológico (Figura 9).

A

B

Figura 8: Retirada de rodilla izquierda mediante sección a nivel de fémur distal (A) y tibia proximal (B).

Figura 9: Orientación de la muestra obtenida en el casette en plano frontal/coronal previa a su procesado y análisis histopatológico con código alfanumérico que permite mantener el registro y la trazabilidad de la muestra.

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Las muestras fueron fijadas en formaldehido al 4% y descalcificadas en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y procesadas con el equipo X-PRESS X50 (Sakura Company, Torrance, Califormia, USA 90501) e infiltradas en parafina con la estación de inclusión de Leica. En cada portaobjetos se montaron 3 secciones de tejido a distinto nivel de 3 µm de espesor cada uno. Los cortes se realizaron con el microtomo de rotación de Leica (CM1950). Entre cada corte se desbastaban 50 micras hasta alcanzar la profundidad deseada. Se realizaron previsualizaciones en microscopio óptico previas a la tinción con O-Safranina para valorar si era la zona de estudio adecuada y si la muestra era representativa.

Una vez secadas éstas en estufa a 37º toda la noche, se desparafinaron, hidrataron y colorearon con la técnica de tinción O-Safranina. Terminada la tinción se deshidrató y se montó con medio de montaje permanente DPX (DPX es una resina acrílica con base de xileno y es el más popular de todos los medios de montaje que permite que las preparaciones se puedan limpiar fácilmente después de montar. No decolora y puede utilizarse con una gran variedad de tinciones).

Desparafinar: Se pasan las preparaciones por cubetas que contienen xilol (2 cubetas), luego series de alcoholes de graduación decreciente (OH de 100º, OH 100º, OH 96º, OH 70º) y finalmente se pasan por agua corriente, 5 minutos en cada reactivo. Seguidamente se pasa por la hematoxilina-eosina (HE) de Harris 3 minutos para la coloración nuclear. Se pasan por ácido acético, lavado con agua destilada y coloración con Fast Green (que colorea el citoplasma), 7 minutos. Seguidamente se elimina el exceso del colorante con ácido acético, y se sumerge en la solución de safranina (Safranina al 0.1% en agua destilada). Finalmente se deshidratan, pasando por OH 96º, OH 100º, OH 100º, xilol, xilol (1 minuto en cada cubeta), y se montan las preparaciones con el medio de montaje permanente.

Tras esto, todas las preparaciones fueron escaneadas mediante Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss^{R}) y digitalizadas en formato .CZI. Finalmente se llevó a cabo un análisis microscópico mediante el software Zen 3.0 Blue Edition (Carl Zeiss^{R}).

Se realizó un análisis ciego microscópico de las preparaciones. Cada preparación, constaba de 3 cortes de la articulación de la rodilla a distintos niveles de profundidad. Se puntuaron los 4 cuadrantes de la articulación (cóndilos femorales medial y lateral y platillos tibiales medial y lateral) en los cortes donde se observaba mayor daño articular.

Se utilizo escala de la OARSI *(del inglés ¨Osteoarthritis Research Society International)* que resumidamente consta de 6 grados (Pritzker et al., 2006):

Grado 0: superficie y cartílago intactos

Grado 1: superficie intacta

Grado 2: discontinuidad en la superficie

Grado 3: fisuras verticales

Grado 4: erosión

Grado 5: denudación

Grado 6: deformación

La escala OARSI establece además 5 estadios:

Estadio 0: no artrosis

Estadio 1: <10% superficie articular afectada

Estadio 2: 10-25% de superficie articular afectada

Estadio 3: entre 25-50% de la superficia articular afectada

Estadio 4: >50% superficie afectada

El score OARSI resulta de multiplicar grado por estadio.

También se utilizó una escala de valoración semicuantitativa descrita por Chambers y cols. (Chambers et al., 1997) y modificado por Glasson y cols. (Glasson et al., 2007). Brevemente:

0: cartílago normal

0,5: pérdida de O-Safranina sin lesiones estructurales

1: rugosidad de la superficie articular y pequeñas fibrilaciones

2: fibrilación debajo de la capa superficial y alguna pérdida de lámina

3: fibrilaciones que se extienden a <20% de espesor del cartílago

5: fibrilación y erosiones que se extienden del 20 al 80% de espesor del cartílago

6: erosión del cartílago >80% de espesor.

La puntuación 4 fue eliminada por Glasson y cols. (Glasson et al., 2007).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el Software Statview-Statgraphics versión 5.0.1 (SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte, EE. UU.). Los datos descriptivos fueron expresados en media ± error estándar (EE). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney para examinar las diferencias entre ratones machos y hembras en cada grupo, mientras que el test de Kruskal-Wallis y de Fisher se utilizaron para examinar las diferencias entre los grupos. Se consideró un valor de $p < 0,05$ estadísticamente significativo.

RESULTADOS

VALIDACIÓN DEL MODELO DMM PARA INDUCCIÓN DE ARTROSIS EN RATÓN

Para validar el procedimiento quirúrgico como inductor de artrosis en el ratón, se ha llevado a cabo la desestabilización del menisco medial mediante la sección del ligamento meniscomedial en las rodillas derechas de los ratones mientras que la rodilla izquierda ha sido utilizada como control, llevándose a cabo cirugía simulada realizando el acceso articular y posterior cierre del mismo sin intervenir sobre ninguna estructura meniscal o ligamentosa. Se ha logrado inducir artrosis claramente en las rodillas derechas a las 8 semanas de la cirugía en machos y hembras si se compara con las rodillas izquierdas (cirugía simulada) (Figura10).

Por otra parte, no se han encontrado diferencias en las rodillas izquierdas (cirugía simulada) en todos los grupos en cuanto al desarrollo de artrosis si se comparan machos y hembras, con valores muy bajos en las escalas utilizadas. Todos estos datos sirven para determinar que el modelo DMM sirve para inducir artrosis en rodillas en un modelo murino (Glasson et al., 2007).

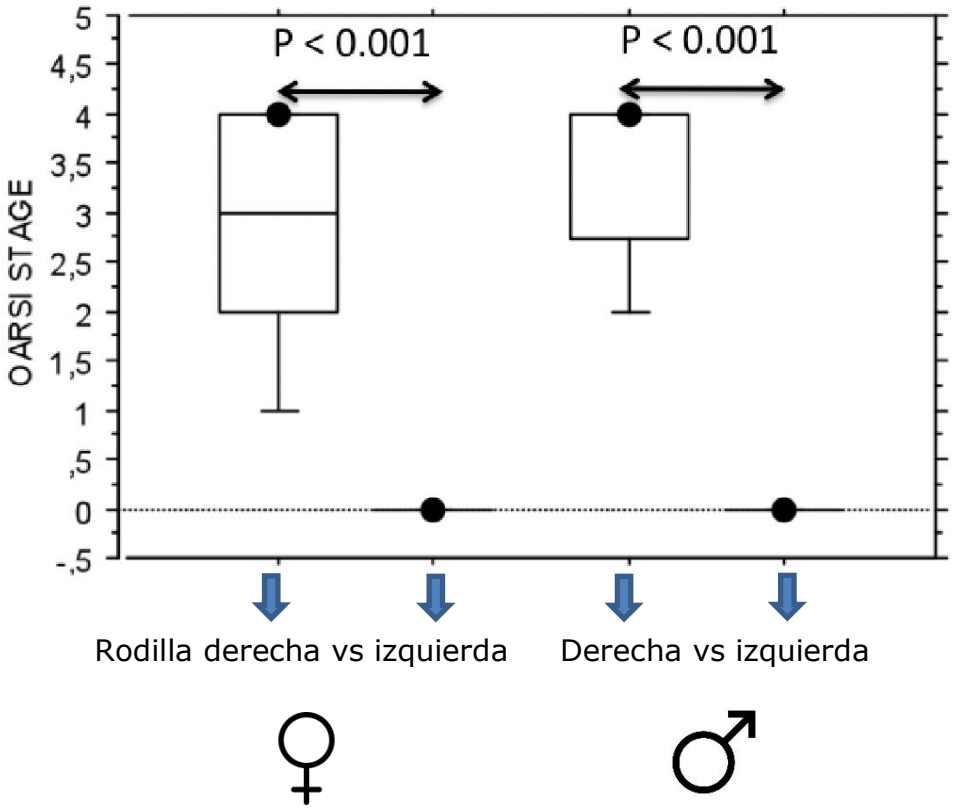


Figura 10: Comparación de la severidad de la artrosis según el estadio OARSI de las rodillas derechas e izquierdas en los ratones macho y hembra. Los datos se presentan como media ± error estándar (EE).

En los estudios anatomopatológicos puede observarse la ausencia de lesiones en el cartílago articular que mantiene una superficie lisa e intacta en las rodillas izquierdas de cualquiera de los especímenes (Figuras 11 y 13). Por el contrario, si se observa las rodillas derechas (intervenidas), los cambios artrósicos degenerativos (fibrilaciones y erosión cartilaginosa) se encuentran en especial en el lado medial con respecto al lado lateral (Figuras 12 Y 14).

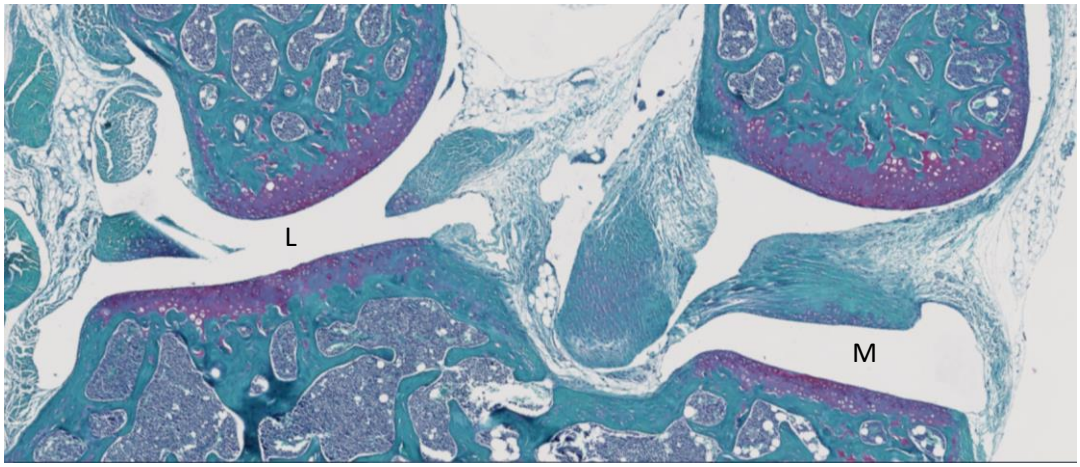


Figura 11: Corte histológico de rodilla izquierda (no intervenida) de ratón control –wt-. M: medial y L: lateral.

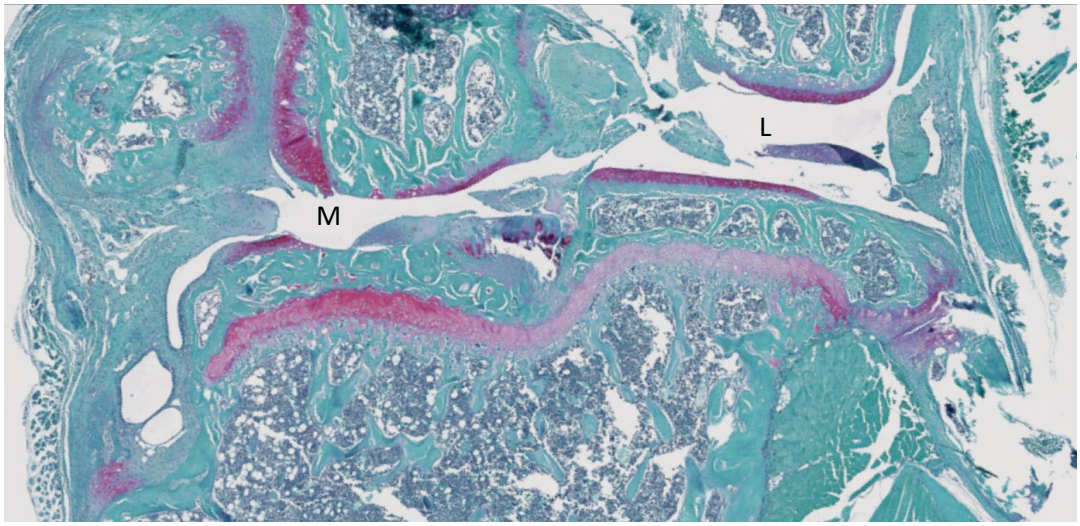


Figura 12: Corte histológico de rodilla derecha (intervenida) de ratón control -wt-. M: medial y L: lateral.

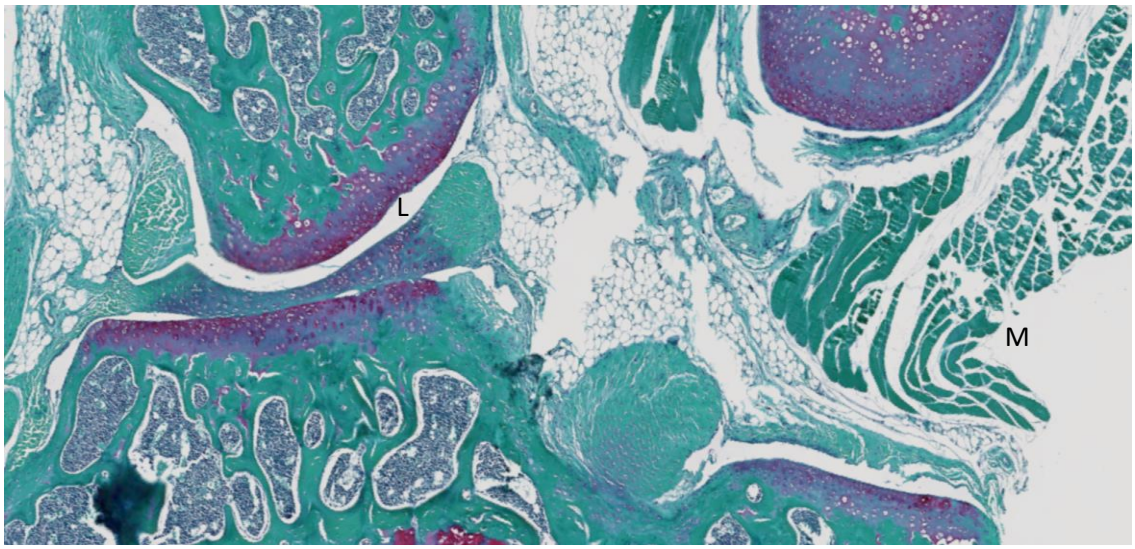


Figura 13: Corte histológico de rodilla izquierda (no intervenida) de ratón macho GzmA $^{-/-}$. M: medial y L: lateral

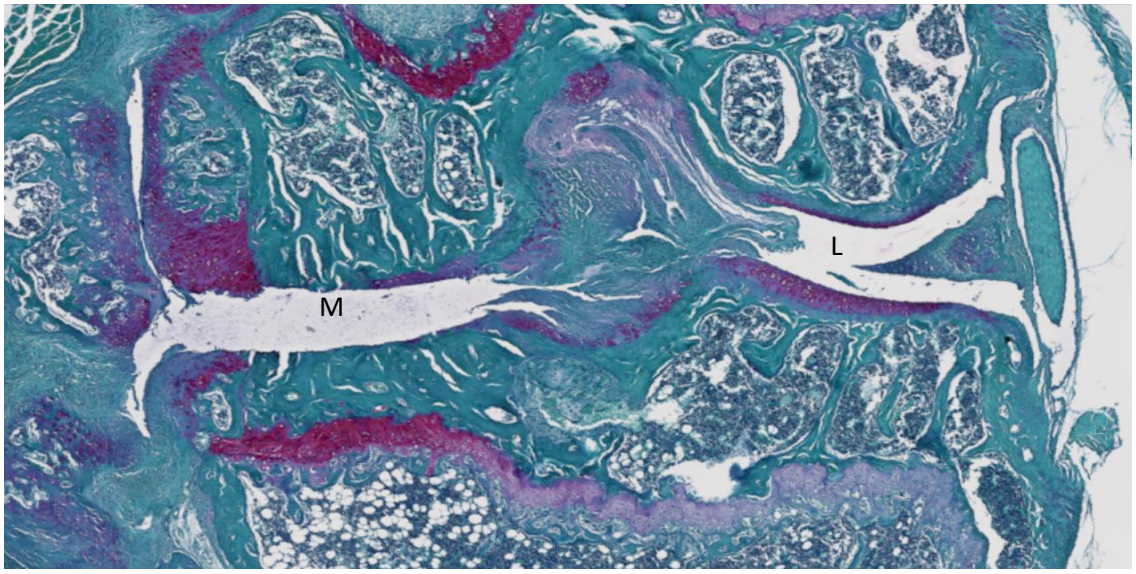


Figura 14: Corte histológico de rodilla derecha (intervenida) de ratón hembra Gzm A$^{-/-}$. M: medial y L: lateral

PAPEL DEL SEXO EN EL DESARROLLO DE ARTROSIS EN UN MODELO DMM.

Tras validar el modelo quirúrgico DMM como inductor de artrosis, se quiso comprobar si había diferencias entre las distintas cepas en función del sexo del animal en las rodillas derechas intervenidas.

Comparativa entre rodillas derechas de ratones control -wt- macho y hembra.

Los valores obtenidos en la escala de OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson fueron superiores en los ratones –wt- machos respecto a las hembras –wt-, lo que significa, que el grado de artrosis que se produjo en las rodillas derechas de los ratones –wt- machos fue superior al de las hembras del mismo grupo (Figura 15, Tabla 1).

Al comparar la severidad de la artrosis en machos y hembras –wt-, los machos del grupo control mostraron mayor severidad de artrosis en score OARSI, de forma estadísticamente significativa ($p<0,05$) en los cuadrantes laterales (Tabla 2,3 y 4). Sin embargo, en este mismo grupo control, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el cuadrante femorotibial (FT) medial, justo donde se llevo a cabo la desestabilización del menisco medial, aunque mostraron peores valores los machos control respecto de las hembras control igualmente. Estas diferencias estadísticamente significativas también fueron observadas en la escala de Glasson (Figura 16, Tabla 2 y 3).

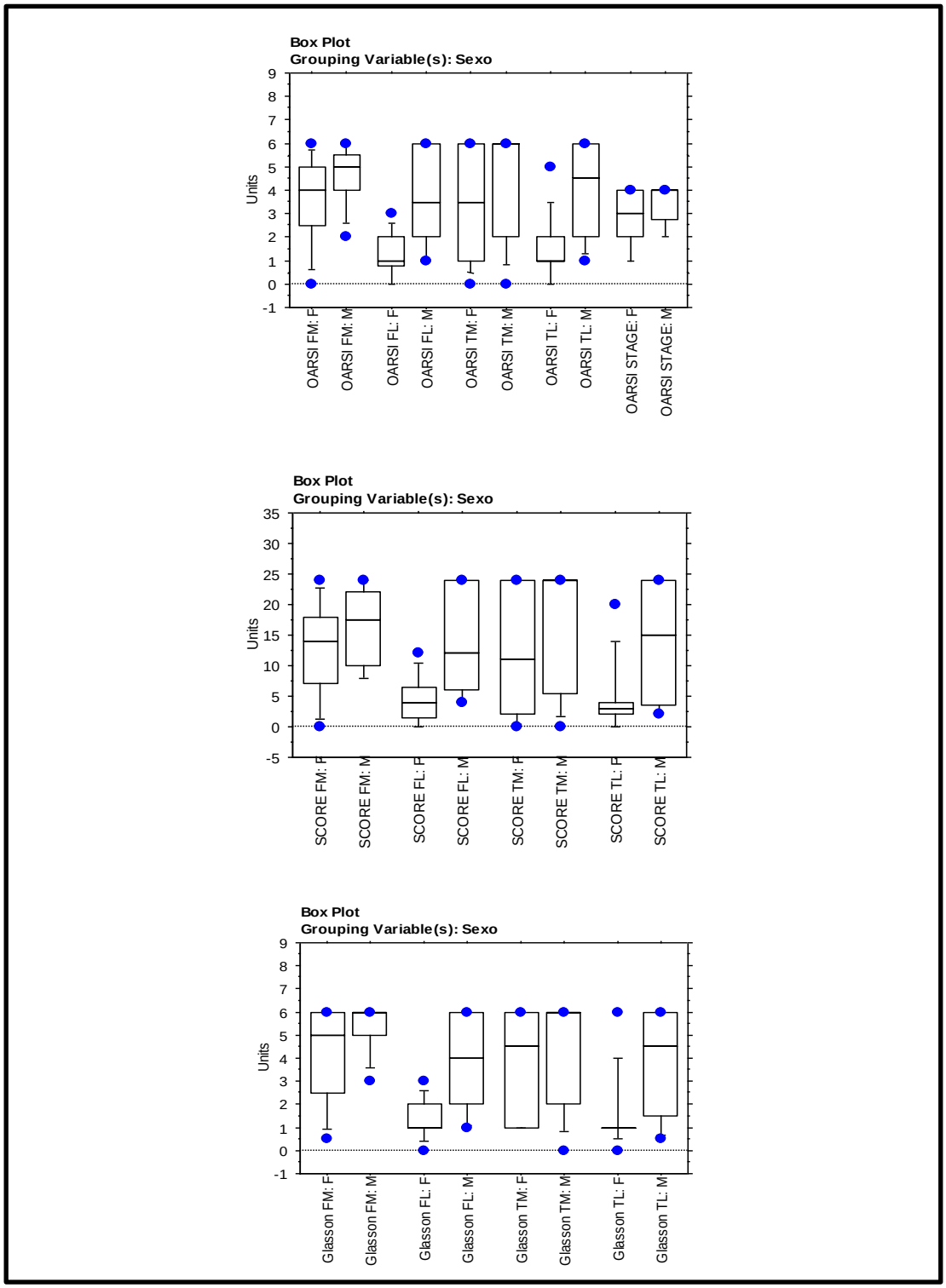


Figura 15: Comparativa entre ratones –wt- macho (M) y hembra (F) en los cuadrantes FT en las diferentes escalas utilizadas en el estudio. Fémur medial (FM), fémur lateral (FL), tibia medial (TM) y tibia lateral (TL).

Means Table for OARSI FM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	3,625	1,923	,680
M	5	4,600	1,673	,748

Means Table for OARSI FL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	1,500	,926	,327
M	5	4,000	2,121	,949

Means Table for SCORE FM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	12,750	7,996	2,827
M	5	17,600	7,266	3,250

Means Table for Glasson FM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	4,188	2,103	,744
M	5	5,200	1,304	,583

Means Table for OARSI TM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	4,125	1,959	,693
M	5	4,800	2,683	1,200

Means Table for SCORE FL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	5,000	3,703	1,309
M	5	15,200	8,672	3,878

Means Table for Glasson FL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	1,500	,926	,327
M	5	4,200	2,168	,970

Means Table for OARSI TL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	1,500	1,512	,535
M	5	5,200	1,789	,800

Means Table for SCORE TM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	14,500	8,992	3,179
M	5	19,200	10,733	4,800

Means Table for Glasson TM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	4,375	2,326	,822
M	5	4,800	2,683	1,200

Means Table for OARSI STAGE
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	3,250	1,035	,366
M	5	3,800	,447	,200

Means Table for SCORE TL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	5,500	6,302	2,228
M	5	20,400	8,050	3,600

Means Table for Glasson TL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	1,500	1,852	,655
M	5	5,000	2,236	1,000

Tabla 1: valores medios obtenidos en los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones macho (M) y hembra (F) –wt-. Valores expresados en media (mean) + error estándar (Std.Err.) FM: fémur medial; FL: fémur lateral; TM: platillo tibial medial; TL: platillo tibial lateral.

Fisher's PLSD for OARSI FM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-,975	2,304	,3716	

Fisher's PLSD for OARSI FL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-2,500	1,853	,0128	S

Fisher's PLSD for SCORE FM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-4,850	9,710	,2951	

Fisher's PLSD for Glasson FM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-1,013	2,325	,3584	

Fisher's PLSD for OARSI TM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-,675	2,823	,6091	

Fisher's PLSD for SCORE FL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-10,200	7,536	,0125	S

Fisher's PLSD for Glasson FL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-2,700	1,884	,0092	S

Fisher's PLSD for OARSI TL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-3,700	2,030	,0020	S

Fisher's PLSD for SCORE TM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-4,700	12,123	,4117	

Fisher's PLSD for Glasson TM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-,425	3,089	,7677	

Fisher's PLSD for OARSI STAGE
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-,550	1,090	,2904	

Fisher's PLSD for SCORE TL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-14,900	8,769	,0033	S

Fisher's PLSD for Glasson TL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-3,500	2,510	,0107	S

Tabla 2: comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones control –wt- macho (M) y hembra (F). Test de Fisher. P<0,05 (flecha roja). FM: fémur medial; FL: fémur lateral; TM: platillo tibial medial; TL: platillo tibial lateral.

Mann-Whitney U for OARSI FM
Grouping Variable: Sexo

U	21,500
U Prime	42,500
Z-Value	-1,103
P-Value	,2701
Tied Z-Value	-1,132
Tied P-Value	,2575
# Ties	4

4 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI FM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	8	57,500	7,188
M	8	78,500	9,813

4 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for OARSI FL
Grouping Variable: Sexo

U	8,500
U Prime	45,500
Z-Value	-2,180
P-Value	,0292
Tied Z-Value	-2,226
Tied P-Value	,0260
# Ties	5

5 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI FL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	53,500	5,944
M	6	66,500	11,083

5 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for OARSI TM
Grouping Variable: Sexo

U	35,500
U Prime	54,500
Z-Value	-,776
P-Value	,4379
Tied Z-Value	-,809
Tied P-Value	,4187
# Ties	5

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI TM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	10	90,500	9,050
M	9	99,500	11,056

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for OARSI TL
Grouping Variable: Sexo

U	10,500
U Prime	69,500
Z-Value	-2,621
P-Value	,0088
Tied Z-Value	-2,700
Tied P-Value	,0069
# Ties	4

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI TL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	10	65,500	6,550
M	8	105,500	13,188

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE FM
Grouping Variable: Sexo

U	24,500
U Prime	39,500
Z-Value	-,788
P-Value	,4309
Tied Z-Value	-,794
Tied P-Value	,4271
# Ties	5

4 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE FM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	8	60,500	7,563
M	8	75,500	9,438

4 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE FL
Grouping Variable: Sexo

U	8,000
U Prime	46,000
Z-Value	-2,239
P-Value	,0251
Tied Z-Value	-2,274
Tied P-Value	,0230
# Ties	5

5 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE FL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	53,000	5,889
M	6	67,000	11,167

5 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE TM
Grouping Variable: Sexo

U	35,500
U Prime	54,500
Z-Value	-,776
P-Value	,4379
Tied Z-Value	-,807
Tied P-Value	,4196
# Ties	4

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE TM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	10	90,500	9,050
M	9	99,500	11,056

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE TL
Grouping Variable: Sexo

U	17,000
U Prime	63,000
Z-Value	-2,044
P-Value	,0410
Tied Z-Value	-2,077
Tied P-Value	,0378
# Ties	4

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE TL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	10	72,000	7,200
M	8	99,000	12,375

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson FM
Grouping Variable: Sexo

U	21,000
U Prime	43,000
Z-Value	-1,155
P-Value	,2480
Tied Z-Value	-1,246
Tied P-Value	,2129
# Ties	3

4 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for Glasson FM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	8	57,000	7,125
M	8	79,000	9,875

4 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson FL
Grouping Variable: Sexo

U	9,000
U Prime	45,000
Z-Value	-2,121
P-Value	,0339
Tied Z-Value	-2,185
Tied P-Value	,0289
# Ties	4

5 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for Glasson FL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	54,000	6,000
M	6	66,000	11,000

5 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson TM
Grouping Variable: Sexo

U	40,000
U Prime	50,000
Z-Value	-,408
P-Value	,6831
Tied Z-Value	-,444
Tied P-Value	,6569
# Ties	4

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for Glasson TM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	10	95,000	9,500
M	9	95,000	10,556

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson TL
Grouping Variable: Sexo

U	19,000
U Prime	61,000
Z-Value	-1,866
P-Value	,0621
Tied Z-Value	-1,976
Tied P-Value	,0482
# Ties	3

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for Glasson TL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	10	74,000	7,400
M	8	97,000	12,125

2 cases were omitted due to missing values.

Tabla 3: comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones control –wt- macho (M) y

hembra (F). Test de U Mann-Whitney. p<0,05 (flecha roja). FM: fémur medial; FL: fémur lateral; TM: platillo tibial medial; TL: platillo tibial lateral.

CUADRANTE	MACHOS	HEMBRAS
FM	16,37 ± 2,33	12,75 ± 2,83
FL	**13,67 ± 3,52 ***	**5,00 ± 1,31 ***
TM	15,11 ± 3,56	14,50 ± 3,18
TL	**13,87 ± 3,85 ***	**5,50 ± 2,23 ***

Tabla 4: score OARSI (grado x estadio) en las rodillas derechas del grupo control. FM: fémur medial; FL: fémur lateral; TM: platillo tibial medial; TL: platillo tibial lateral. Media ± error estándar. * p<0,05.

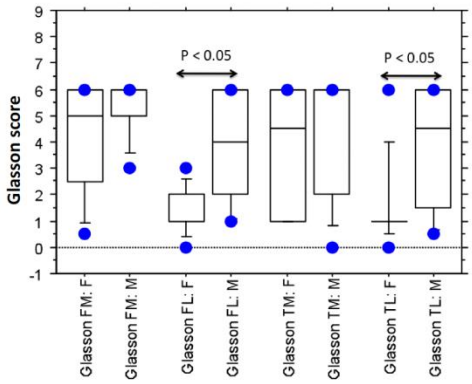
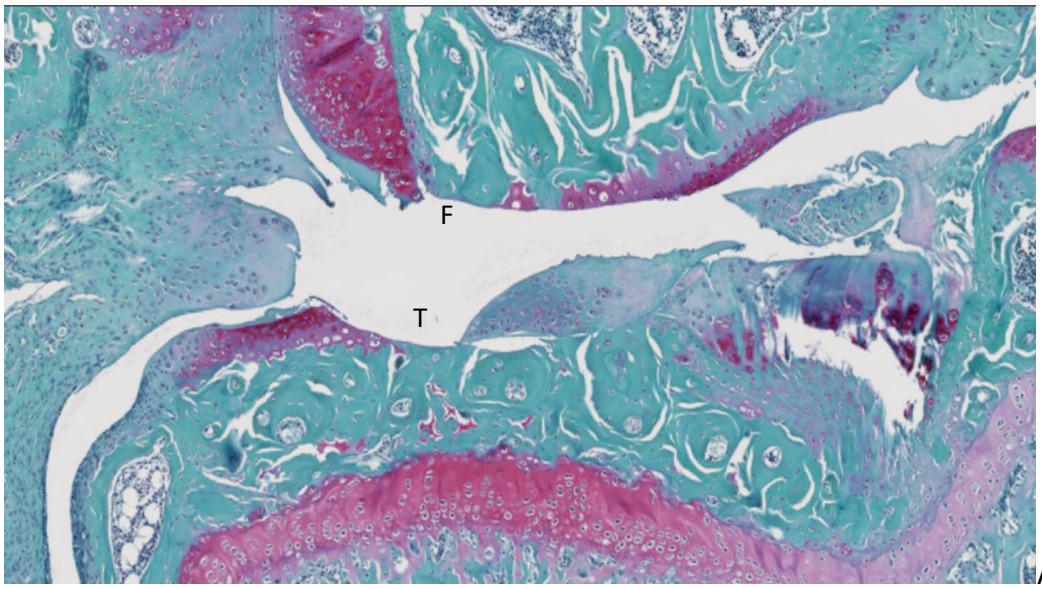
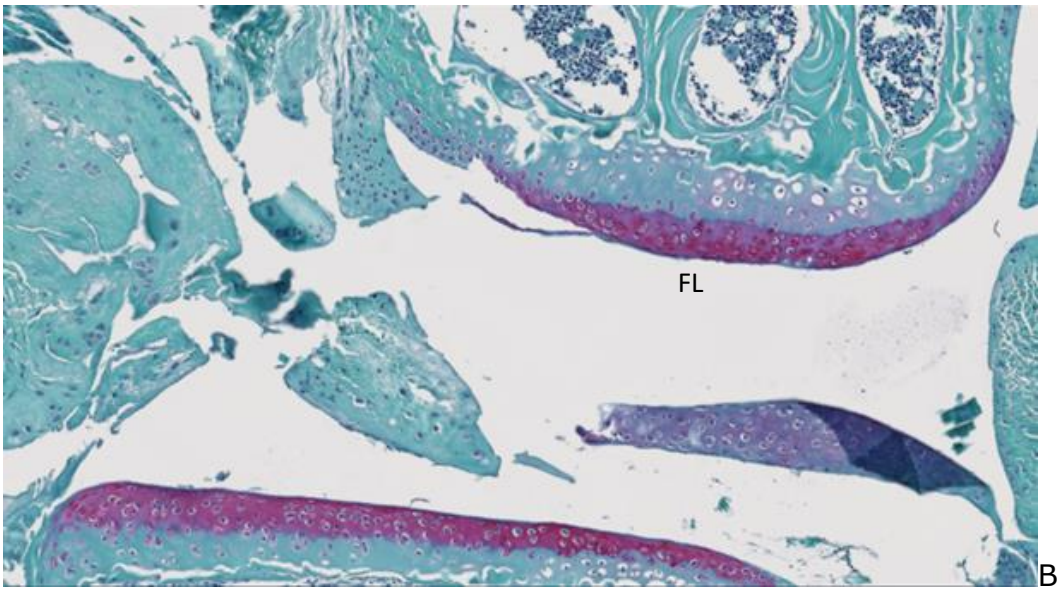


Figura 16: Valores en la escala de Glasson en ratones macho (M) y hembra (F) control –wt- en los diferentes cuadrantes de la rodilla derecha intervenida. FM: fémur medial; FL: fémur lateral; TM: platillo tibial medial; TL: platillo tibial lateral.

Estos valores y puntuaciones obtenidos anteriormente con mayores cambios degenerativos en las rodillas derechas de los ratones macho –wt- respecto a las rodillas derechas de las hembras –wt- se obtienen del análisis de las preparaciones histológicas (Figuras 17 y 18)



A



B

Figura 17: Corte histológico de rodilla derecha, lado medial (A) y lado lateral (B) de ratón –wt- hembra. En la imagen superior(A) se observa que el lado medial presenta una denudación importante del cartílago en fémur (F) y tibia (T). En lado lateral (B) está bastante indemne presentando únicamente una pequeña fibrilación en el fémur lateral (FL).

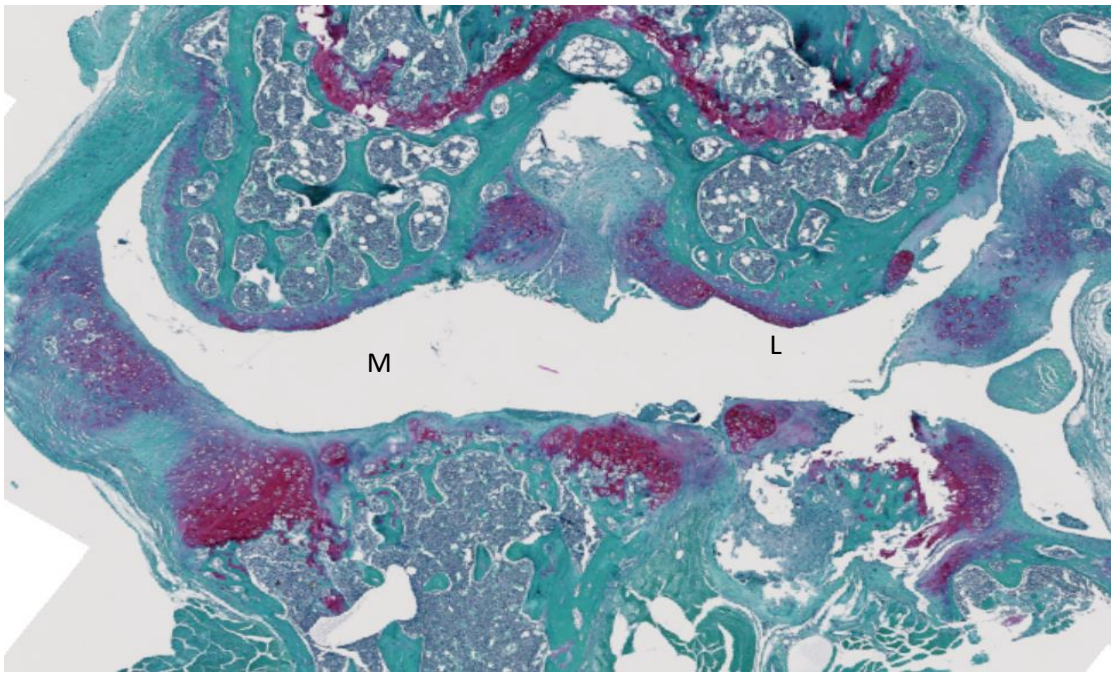


Figura 18: Corte histolóigico de rodilla derecha de ratón macho –wt-. Se aprecian erosiones profundas, condrogénesis bilateral e importante deformidad articular global en los 4 cuadrantes FT. Lado medial (M) y lado lateral (L)

Comparativa entre rodillas derechas de ratones GzmA -/- macho y hembra.

Los valores medios obtenidos en las 4 escalas utilizadas en el estudio, mostraron mayores cambios degenerativos en ratones macho GzmA$^{-/-}$ respecto de las hembras de la misma cepa en todos los cuadrantes FT (Figura 19, tabla 5). Estas diferencias alcanzaron significación estadística en tibia medial y tibia lateral (tablas 6 y 7)

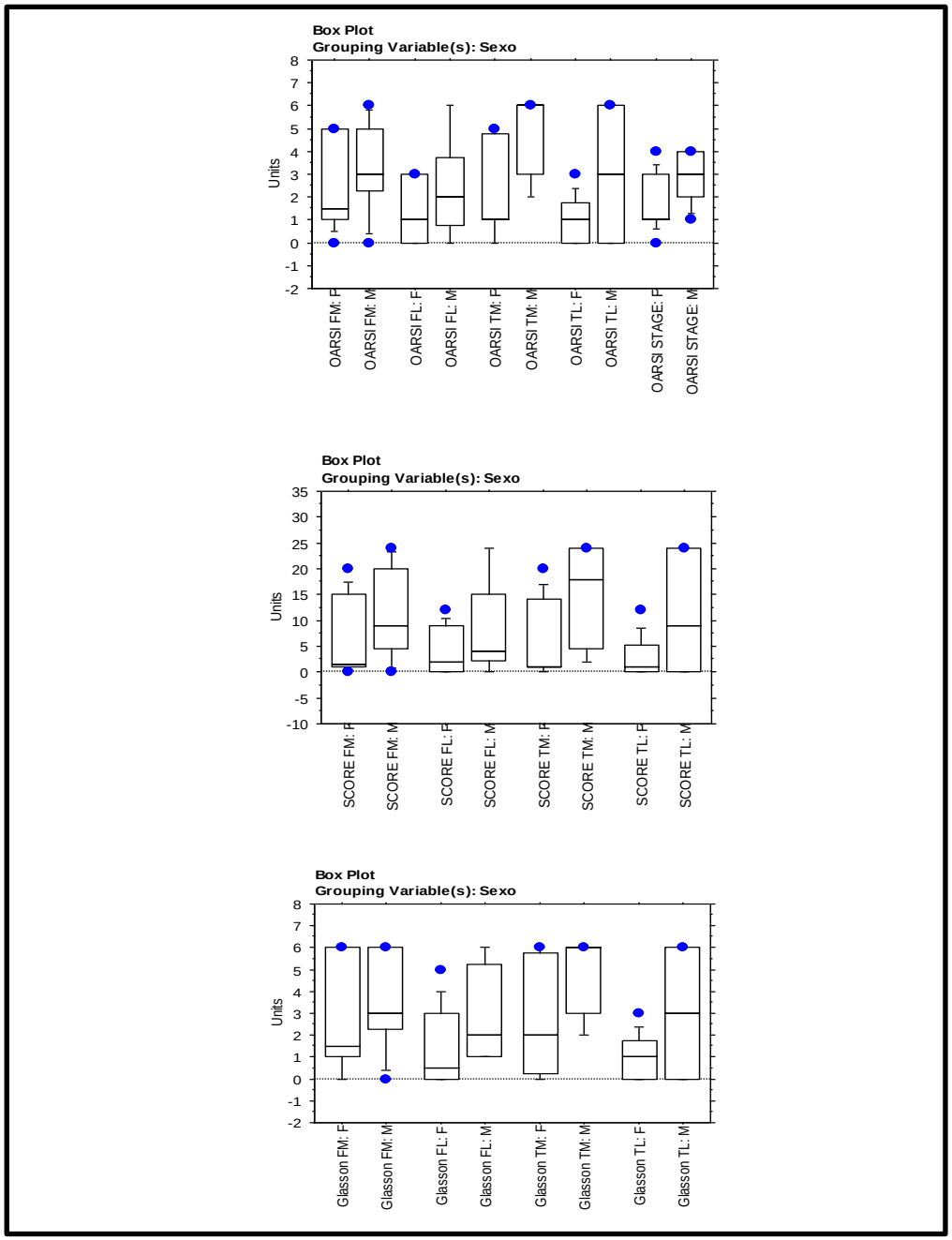


Figura 19: Comparativa entre ratones GzmA$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F) en los cuadrantes FT en las diferentes escalas utilizadas en el estudio. Fémur medial (FM), fémur lateral (FL), tibia medial (TM) y tibia lateral (TL).

Means Table for OARSI FM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	9	2,778	2,167	,722
M	4	3,250	2,754	1,377

Means Table for OARSI FL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	9	1,222	1,394	,465
M	4	2,500	2,646	1,323

Means Table for SCORE FM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	9	7,778	8,197	2,732
M	4	12,000	11,776	5,888

Means Table for Glasson FM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	9	3,222	2,682	,894
M	4	3,500	3,000	1,500

Means Table for OARSI TM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	9	2,333	2,179	,726
M	4	6,000	0,000	0,000

Means Table for SCORE FL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	9	3,778	4,842	1,614
M	4	9,750	10,782	5,391

Means Table for Glasson FL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	9	1,333	1,871	,624
M	4	3,250	2,630	1,315

Means Table for OARSI TL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	9	1,000	1,118	,373
M	4	4,500	3,000	1,500

Means Table for SCORE TM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	9	6,889	7,960	2,653
M	4	19,500	5,745	2,872

Means Table for Glasson TM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	9	2,778	2,587	,862
M	4	6,000	0,000	0,000

Means Table for OARSI STAGE
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	9	1,889	1,364	,455
M	4	3,250	,957	,479

Means Table for SCORE TL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	9	2,889	4,226	1,409
M	4	16,500	11,358	5,679

Means Table for Glasson TL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	9	1,000	1,118	,373
M	4	4,500	3,000	1,500

Tabla 5: valores medios obtenidos en cada uno de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones GzmA$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F). Valores expresados en media (mean) + error estándar (Std.Err.). FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral.

Fisher's PLSD for OARSI FM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-,472	3,097	,7435	

Fisher's PLSD for OARSI FL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-1,278	2,411	,2681	

Fisher's PLSD for OARSI TM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-3,667	2,458	,0073	S

Fisher's PLSD for OARSI TL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-3,500	2,426	,0088	S

Fisher's PLSD for OARSI STAGE
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-1,361	1,675	,1012	

Fisher's PLSD for SCORE FM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-4,222	12,314	,4663	

Fisher's PLSD for SCORE FL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-5,972	9,235	,1824	

Fisher's PLSD for SCORE TM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-12,611	9,816	,0164	S

Fisher's PLSD for SCORE TL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-13,611	9,180	,0076	S

Fisher's PLSD for Glasson FM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-,278	3,667	,8706

Fisher's PLSD for Glasson FL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-1,917	2,784	,1579

Fisher's PLSD for Glasson TM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-3,222	2,918	,0334	S

Fisher's PLSD for Glasson TL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-3,500	2,426	,0088	S

Tabla 6: Comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en GzmA $^{-/-}$ macho (M) y hembra (F). Test de Fisher. $p<0.05$ (flecha roja). FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral.

Mann-Whitney U for OARSI FM
Grouping Variable: Sexo

U	26,000
U Prime	44,000
Z-Value	-,878
P-Value	,3798
Tied Z-Value	-,905
Tied P-Value	,3653
# Ties	5

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI FM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	10	81,000	8,100
M	7	72,000	10,286

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for OARSI FL
Grouping Variable: Sexo

U	17,000
U Prime	33,000
Z-Value	-,980
P-Value	,3272
Tied Z-Value	-1,017
Tied P-Value	,3093
# Ties	3

4 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI FL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	10	72,000	7,200
M	5	48,000	9,600

4 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for OARSI TM
Grouping Variable: Sexo

U	10,000
U Prime	67,000
Z-Value	-2,581
P-Value	,0098
Tied Z-Value	-2,630
Tied P-Value	,0085
# Ties	5

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI TM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	11	76,000	6,909
M	7	95,000	13,571

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for OARSI TL
Grouping Variable: Sexo

U	25,500
U Prime	40,500
Z-Value	-,754
P-Value	,4510
Tied Z-Value	-,801
Tied P-Value	,4233
# Ties	4

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI TL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	11	91,500	8,318
M	6	61,500	10,250

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE FM
Grouping Variable: Sexo

U	22,500
U Prime	47,500
Z-Value	-1,220
P-Value	,2225
Tied Z-Value	-1,234
Tied P-Value	,2171
# Ties	4

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE FM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	10	77,500	7,750
M	7	75,500	10,786

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE FL
Grouping Variable: Sexo

U	15,500
U Prime	34,500
Z-Value	-1,164
P-Value	,2446
Tied Z-Value	-1,191
Tied P-Value	,2335
# Ties	4

4 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE FL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	10	70,500	7,050
M	5	49,500	9,900

4 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE TM
Grouping Variable: Sexo

U	14,500
U Prime	62,500
Z-Value	-2,174
P-Value	,0297
Tied Z-Value	-2,194
Tied P-Value	,0282
# Ties	6

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE TM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	11	80,500	7,318
M	7	90,500	12,929

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE TL
Grouping Variable: Sexo

U	25,500
U Prime	40,500
Z-Value	-,754
P-Value	,4510
Tied Z-Value	-,797
Tied P-Value	,4252
# Ties	4

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE TL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	11	91,500	8,318
M	6	61,500	10,250

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson FM
Grouping Variable: Sexo

U	27,500
U Prime	42,500
Z-Value	-,732
P-Value	,4642
Tied Z-Value	-,763
Tied P-Value	,4452
# Ties	5

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for Glasson FM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	10	82,500	8,250
M	7	70,500	10,071

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson FL
Grouping Variable: Sexo

U	11,500
U Prime	38,500
Z-Value	-1,653
P-Value	,0982
Tied Z-Value	-1,703
Tied P-Value	,0886
# Ties	4

4 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for Glasson FL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	10	66,500	6,650
M	5	53,500	10,700

4 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson TM
Grouping Variable: Sexo

U	18,500
U Prime	58,500
Z-Value	-1,811
P-Value	,0701
Tied Z-Value	-1,905
Tied P-Value	,0568
# Ties	4

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for Glasson TM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	11	84,500	7,682
M	7	86,500	12,357

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson TL
Grouping Variable: Sexo

U	25,500
U Prime	40,500
Z-Value	-,754
P-Value	,4510
Tied Z-Value	-,801
Tied P-Value	,4233
# Ties	4

2 cases were omitted due to missing values.

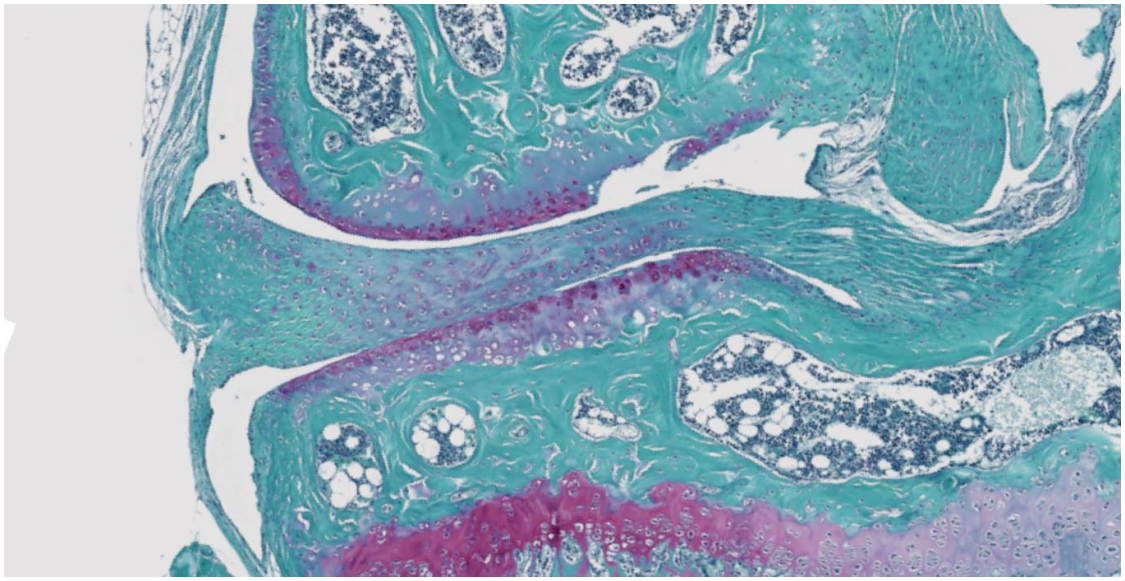
Mann-Whitney Rank Info for Glasson TL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	11	91,500	8,318
M	6	61,500	10,250

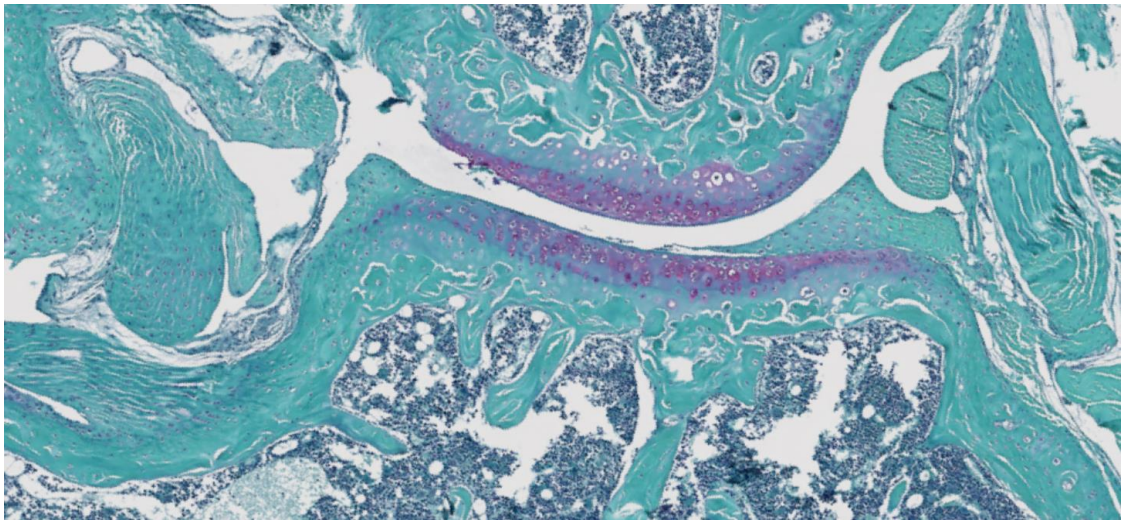
2 cases were omitted due to missing values.

Tabla 7: comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones GzmA$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F). Test de U Mann-Whitney. Nivel de significación estadística p=0,05. Resultados estadísticamente significativos (flecha roja) p<0,05. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

Estos valores y puntuaciones obtenidos anteriormente con mayores cambios degenerativos en las rodillas derechas de los ratones macho GzmA$^{-/-}$ respecto a las rodillas derechas de las hembras GzmA$^{-/-}$ se obtienen del análisis de las preparaciones histológicas (Figuras 20 y 21)



A



B

Figura 20: Corte histológico de rodilla derecha de ratón hembra GzmA $^{-/-}$ lado medial (A) y lado lateral (B). Se observan escasos cambios degenerativos con delaminacion y fibrilación superficial tanto en el lado medial (A), como en el lateral (B).

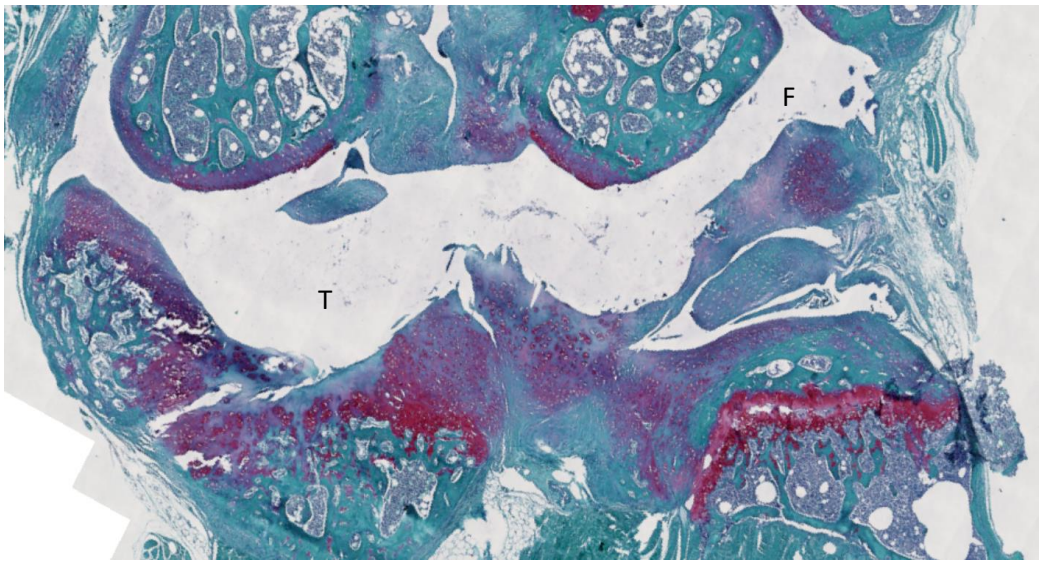


Figura 21: Corte histológico de rodilla derecha de ratón macho GzmA $^{-/-}$. Se aprecian importantes lesiones cartilaginosas con desestruturación y afectación del hueso subcondral tanto a nivel femoral (F) como tibial (T).

Comparativa entre rodillas derechas de ratones GzmB -/- macho y hembra.

Al comparar los valores obtenidos en rodillas derechas de ratones GzmB$^{-/-}$ machos respecto a las hembras, se observa que los valores mayores, y por lo tanto, los cambios degenerativos, eran más acusados en los ratones macho de dicha cepa (Figura 22 y 23 y Tabla 8). Los valores alcanzaron significación estadística tanto en el lado medial como en el lado lateral en las diferentes escalas del estudio (Tablas 9 y 10).

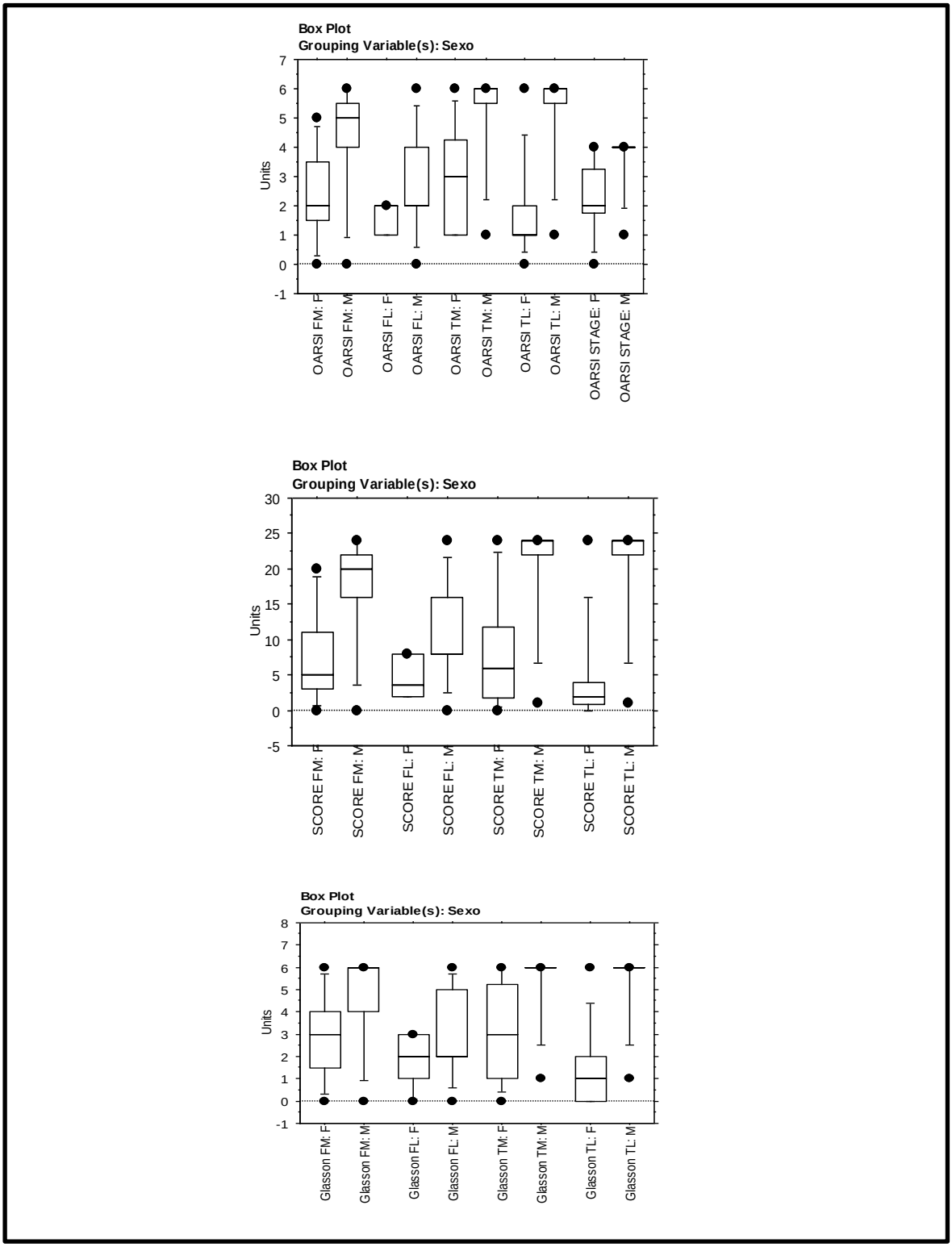


Figura 22: Comparativa entre ratones GzmB$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F) en los cuadrantes FT en las diferentes escalas utilizadas en el estudio. Fémur medial (FM), fémur lateral (FL), tibia medial (TM) y tibia lateral (TL).

Means Table for OARSI FM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	6	2,333	1,862	,760
M	8	4,375	1,996	,706

Means Table for OARSI FL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	6	1,667	,516	,211
M	8	2,750	1,832	,648

Means Table for SCORE FM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	6	8,000	8,099	3,307
M	8	17,500	7,982	2,822

Means Table for Glasson FM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	6	3,000	2,280	,931
M	8	4,750	2,188	,773

Means Table for OARSI TM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	6	3,333	2,066	,843
M	8	5,250	1,753	,620

Means Table for SCORE FL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	6	4,500	2,811	1,147
M	8	11,000	7,329	2,591

Means Table for Glasson FL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	6	1,833	1,169	,477
M	8	3,000	2,070	,732

Means Table for OARSI TL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	6	2,000	2,000	,816
M	8	5,250	1,753	,620

Means Table for SCORE TM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	6	10,667	9,416	3,844
M	8	20,625	8,052	2,847

Means Table for Glasson TM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	6	3,833	2,639	1,078
M	8	5,375	1,768	,625

Means Table for OARSI STAGE
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	6	2,667	1,211	,494
M	8	3,625	1,061	,375

Means Table for SCORE TL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	6	6,333	8,733	3,565
M	8	20,625	8,052	2,847

Means Table for Glasson TL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	6	1,667	2,251	,919
M	8	5,375	1,768	,625

Tabla 8: valores medios obtenidos en cada uno de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones GzmB$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F). Valores expresados en media (mean) + error estándar (Std.Err.) FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral.

Fisher's PLSD for OARSI FM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-2,042	2,284	,0752	

Fisher's PLSD for OARSI FL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-1,083	1,693	,1885	

Fisher's PLSD for SCORE FM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-9,500	9,450	,0490	S

Fisher's PLSD for Glasson FM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-1,750	2,620	,1713	

Fisher's PLSD for OARSI TM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-1,917	2,223	,0848	

Fisher's PLSD for SCORE FL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-6,500	6,924	,0634	

Fisher's PLSD for Glasson FL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-1,167	2,062	,2412	

Fisher's PLSD for OARSI TL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-3,250	2,188	,0071	S

Fisher's PLSD for SCORE TM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-9,958	10,175	,0543	

Fisher's PLSD for Glasson TM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-1,542	2,558	,2137	

Fisher's PLSD for OARSI STAGE
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-,958	1,325	,1410	

Fisher's PLSD for SCORE TL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-14,292	9,817	,0080	S

Fisher's PLSD for Glasson TL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
F, M	-3,708	2,334	,0047	S

Tabla 9: comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en GzmB $^{-/-}$ macho (M) y hembra (F). Test de Fisher. Nivel de significación estadística p= 0,05. Resultados estadísticamente significativos (flecha roja). FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

Mann-Whitney U for OARSI FM
Grouping Variable: Sexo

U	12,000
U Prime	52,000
Z-Value	-2,100
P-Value	,0357
Tied Z-Value	-2,143
Tied P-Value	,0321
# Ties	5

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for OARSI FL
Grouping Variable: Sexo

U	14,000
U Prime	34,000
Z-Value	-1,291
P-Value	,1967
Tied Z-Value	-1,434
Tied P-Value	,1517
# Ties	3

3 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for OARSI TM
Grouping Variable: Sexo

U	11,500
U Prime	60,500
Z-Value	-2,358
P-Value	,0184
Tied Z-Value	-2,479
Tied P-Value	,0132
# Ties	4

Mann-Whitney Rank Info for OARSI FM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	8	48,000	6,000
M	8	88,000	11,000

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI FL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	6	35,000	5,833
M	8	70,000	8,750

3 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI TM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	56,500	6,278
M	8	96,500	12,063

Mann-Whitney U for OARSI TL
Grouping Variable: Sexo

U	9,500
U Prime	62,500
Z-Value	-2,550
P-Value	,0108
Tied Z-Value	-2,707
Tied P-Value	,0068
# Ties	3

Mann-Whitney U for SCORE FM
Grouping Variable: Sexo

U	11,500
U Prime	52,500
Z-Value	-2,153
P-Value	,0313
Tied Z-Value	-2,192
Tied P-Value	,0284
# Ties	5

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE FL
Grouping Variable: Sexo

U	10,000
U Prime	38,000
Z-Value	-1,807
P-Value	,0707
Tied Z-Value	-1,886
Tied P-Value	,0593
# Ties	3

3 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI TL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	54,500	6,056
M	8	98,500	12,313

Mann-Whitney Rank Info for SCORE FM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	8	47,500	5,938
M	8	88,500	11,063

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE FL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	6	31,000	5,167
M	8	74,000	9,250

3 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE TM
Grouping Variable: Sexo

U	12,000
U Prime	60,000
Z-Value	-2,309
P-Value	,0209
Tied Z-Value	-2,398
Tied P-Value	,0165
# Ties	4

Mann-Whitney U for SCORE TL
Grouping Variable: Sexo

U	10,500
U Prime	61,500
Z-Value	-2,454
P-Value	,0141
Tied Z-Value	-2,549
Tied P-Value	,0108
# Ties	5

Mann-Whitney U for Glasson FM
Grouping Variable: Sexo

U	15,000
U Prime	49,000
Z-Value	-1,785
P-Value	,0742
Tied Z-Value	-1,850
Tied P-Value	,0642
# Ties	4

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE TM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	57,000	6,333
M	8	96,000	12,000

Mann-Whitney Rank Info for SCORE TL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	55,500	6,167
M	8	97,500	12,188

Mann-Whitney Rank Info for Glasson FM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	8	51,000	6,375
M	8	85,000	10,625

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson FL
Grouping Variable: Sexo

U	17,500
U Prime	30,500
Z-Value	-,839
P-Value	,4014
Tied Z-Value	-,877
Tied P-Value	,3807
# Ties	4

3 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson TM
Grouping Variable: Sexo

U	13,500
U Prime	58,500
Z-Value	-2,165
P-Value	,0304
Tied Z-Value	-2,363
Tied P-Value	,0181
# Ties	3

Mann-Whitney U for Glasson TL
Grouping Variable: Sexo

U	8,000
U Prime	64,000
Z-Value	-2,694
P-Value	,0071
Tied Z-Value	-2,874
Tied P-Value	,0040
# Ties	4

Mann-Whitney Rank Info for Glasson FL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	6	38,500	6,417
M	8	66,500	8,313

3 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for Glasson TM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	58,500	6,500
M	8	94,500	11,813

Mann-Whitney Rank Info for Glasson TL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	53,000	5,889
M	8	100,000	12,500

Tabla 10: comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones GzmA$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F).

Test de U Mann-Whitney. p<0,05 (flecha roja). FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

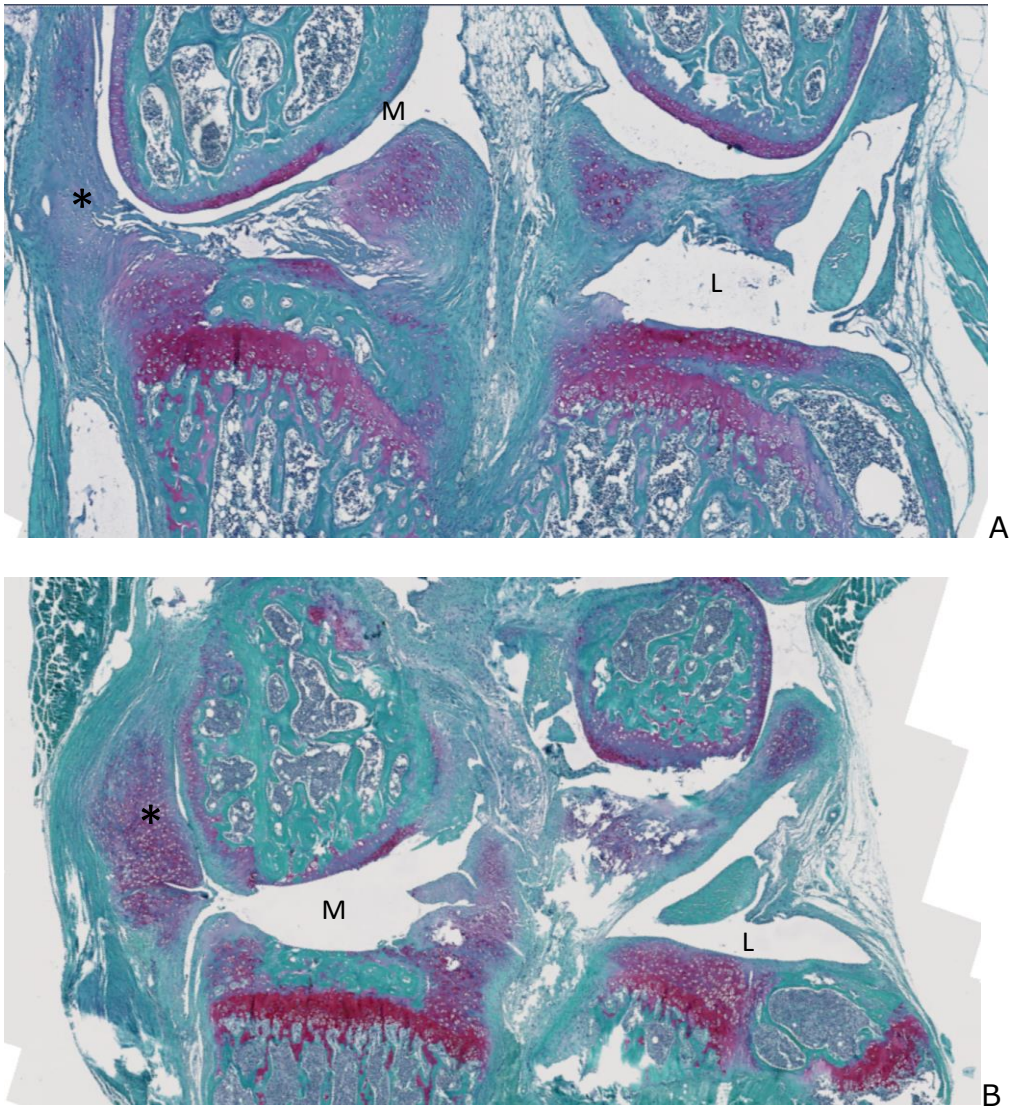


Figura 23: Corte histológico comparativo entre rodillas derechas de ratones Gzm $B^{-/-}$ hembra (A) y macho (B). Se aprecian importantes diferencias entre el ratón hembra (A) y el macho (B), observándose integridad de gran parte del cartílago en los 4 cuadrantes FT del ratón hembra respecto al macho que presenta denudación importante tanto en el lado medial (M) como lateral (L). Nótese el foco de condrogénesis en ambas rodillas que nos ayuda a identificar el lado medial, donde se ha realizado la cirugía (*)

Comparativa entre rodillas derechas de ratones Perf -/- macho y hembra.

En las rodillas derechas de los ratones Perf$^{-/-}$ también se observa mayores cambios degenerativos en los machos respecto a las hembras en los 4 cuadrantes FT en las distintas escalas (Figura 24-26, tabla 11 y 12). Las diferencias fueron estadísticamente significativas en la tibia lateral (Tabla 13)

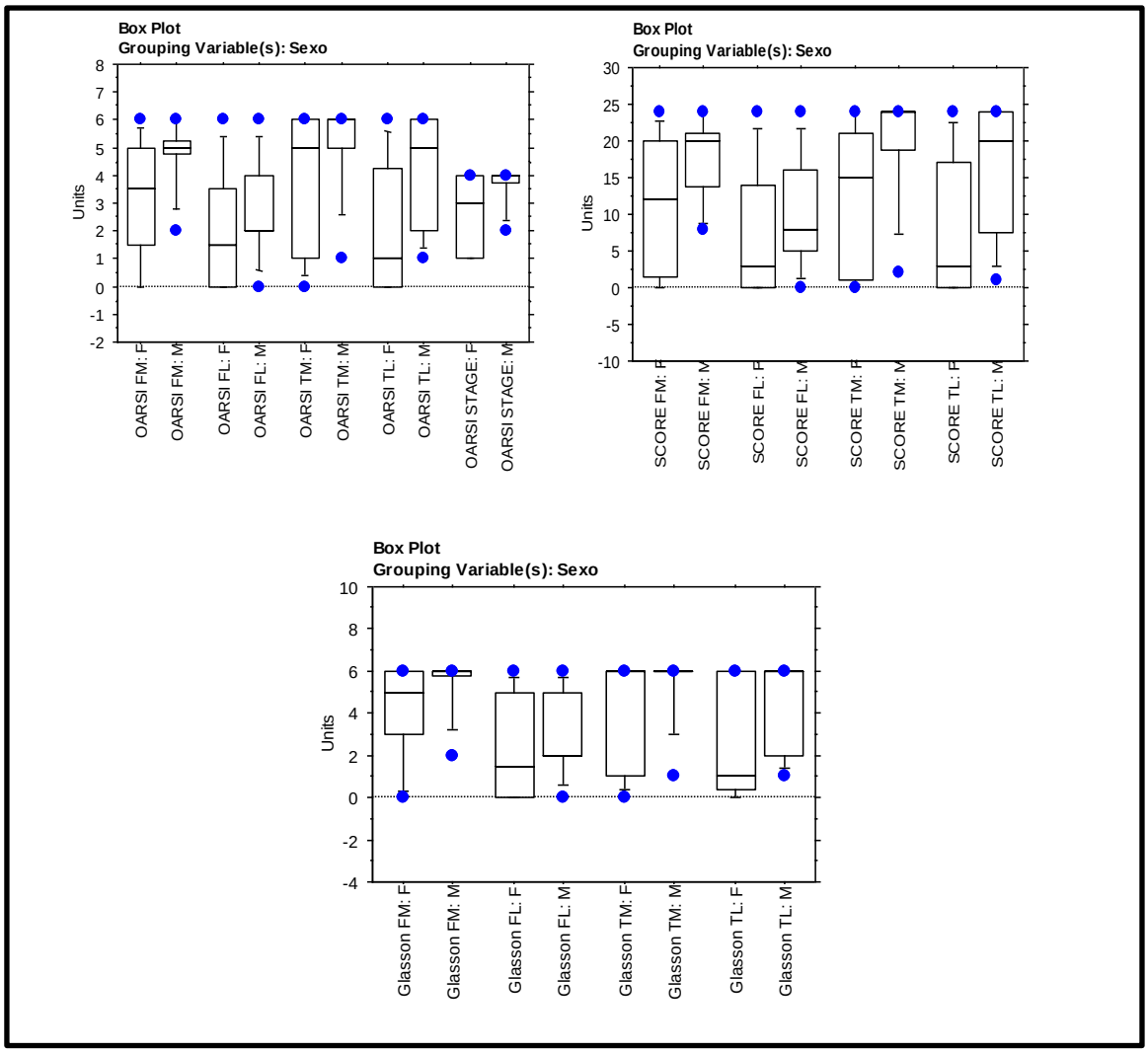


Figura 24: Comparativa entre ratones Perf$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F) en los cuadrantes FT en escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson. Fémur medial (FM), fémur lateral (FL), tibia medial (TM) y tibia lateral (TL).

Means Table for OARSI FM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	3,250	2,252	,796
M	8	4,625	1,188	,420

Means Table for OARSI FL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	2,000	2,204	,779
M	8	2,750	1,832	,648

Means Table for SCORE FM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	11,375	9,546	3,375
M	8	16,625	5,476	1,936

Means Table for Glasson FM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	4,250	2,375	,840
M	8	5,375	1,408	,498

Means Table for OARSI TM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	3,625	2,504	,885
M	8	5,125	1,727	,611

Means Table for SCORE FL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	7,250	9,067	3,206
M	8	10,250	7,815	2,763

Means Table for Glasson FL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	2,375	2,560	,905
M	8	3,000	2,070	,732

Means Table for OARSI TL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	2,500	2,330	,824
M	8	4,625	1,996	,706

Means Table for SCORE TM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	13,125	10,696	3,782
M	8	19,625	7,818	2,764

Means Table for Glasson TM
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	4,000	2,777	,982
M	8	5,375	1,768	,625

Means Table for OARSI STAGE
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	2,750	1,488	,526
M	8	3,625	,744	,263

Means Table for SCORE TL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	8,750	9,662	3,416
M	8	17,875	9,141	3,232

Means Table for Glasson TL
Effect: Sexo

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
F	8	2,938	2,678	,947
M	8	4,875	2,100	,743

Tabla 11: valores medios obtenidos en cada uno de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones Perf$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F). Valores expresados en media (mean) + error estándar (Std.Err.) FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

Fisher's PLSD for OARSI FM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-1,375	1,931	,1489

Fisher's PLSD for OARSI FL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-,750	2,173	,4714

Fisher's PLSD for OARSI TM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-1,500	2,306	,1848

Fisher's PLSD for OARSI TL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-2,125	2,326	,0703

Fisher's PLSD for OARSI STAGE
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-,875	1,262	,1590

Fisher's PLSD for SCORE FM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-5,250	8,345	,1986

Fisher's PLSD for SCORE FL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-3,000	9,077	,4900

Fisher's PLSD for SCORE TM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-6,500	10,047	,1869

Fisher's PLSD for SCORE TL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-9,125	10,086	,0727

Fisher's PLSD for Glasson FM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-1,125	2,094	,2685

Fisher's PLSD for Glasson FL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-,625	2,497	,5997

Fisher's PLSD for Glasson TM
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-1,375	2,497	,2572

Fisher's PLSD for Glasson TL
Effect: Sexo
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
F, M	-1,938	2,581	,1297

Tabla 12: comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, estadio OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones Perf $^{-/-}$ macho (M) y hembra (F). Test de Fisher. Nivel de significación estadística p= 0,05. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

Mann-Whitney U for OARSI FM
Grouping Variable: Sexo

U	20,500
U Prime	51,500
Z-Value	-1,491
P-Value	,1358
Tied Z-Value	-1,553
Tied P-Value	,1205
# Ties	5

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI FM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	8	56,500	7,063
M	9	96,500	10,722

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for OARSI FL
Grouping Variable: Sexo

U	24,000
U Prime	40,000
Z-Value	-,840
P-Value	,4008
Tied Z-Value	-,863
Tied P-Value	,3883
# Ties	4

3 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI FL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	8	60,000	7,500
M	8	76,000	9,500

3 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for OARSI TM
Grouping Variable: Sexo

U	25,000
U Prime	56,000
Z-Value	-1,369
P-Value	,1711
Tied Z-Value	-1,483
Tied P-Value	,1380
# Ties	3

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI TM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	70,000	7,778
M	9	101,000	11,222

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for OARSI TL
Grouping Variable: Sexo

U	18,000
U Prime	63,000
Z-Value	-1,987
P-Value	,0469
Tied Z-Value	-2,022
Tied P-Value	,0432
# Ties	5

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for OARSI TL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	63,000	7,000
M	9	108,000	12,000

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE FM
Grouping Variable: Sexo

U	23,000
U Prime	49,000
Z-Value	-1,251
P-Value	,2110
Tied Z-Value	-1,271
Tied P-Value	,2036
# Ties	4

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE FM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	8	59,000	7,375
M	9	94,000	10,444

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE FL
Grouping Variable: Sexo

U	22,500
U Prime	41,500
Z-Value	-,998
P-Value	,3184
Tied Z-Value	-1,010
Tied P-Value	,3123
# Ties	5

3 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE FL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	8	58,500	7,313
M	8	77,500	9,688

3 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE TM
Grouping Variable: Sexo

U	19,500
U Prime	61,500
Z-Value	-1,854
P-Value	,0637
Tied Z-Value	-1,947
Tied P-Value	,0515
# Ties	4

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE TM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	64,500	7,167
M	9	106,500	11,833

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for SCORE TL
Grouping Variable: Sexo

U	17,000
U Prime	64,000
Z-Value	-2,075
P-Value	,0380
Tied Z-Value	-2,107
Tied P-Value	,0351
# Ties	4

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for SCORE TL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	62,000	6,889
M	9	109,000	12,111

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson FM
Grouping Variable: Sexo

U	21,000
U Prime	51,000
Z-Value	-1,443
P-Value	,1489
Tied Z-Value	-1,629
Tied P-Value	,1034
# Ties	2

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for Glasson FM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	8	57,000	7,125
M	9	96,000	10,667

2 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson FL
Grouping Variable: Sexo

U	25,000
U Prime	39,000
Z-Value	-,735
P-Value	,4622
Tied Z-Value	-,758
Tied P-Value	,4482
# Ties	4

3 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for Glasson FL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	8	61,000	7,625
M	8	75,000	9,375

3 cases were omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson TM
Grouping Variable: Sexo

U	31,000
U Prime	50,000
Z-Value	-,839
P-Value	,4015
Tied Z-Value	-1,156
Tied P-Value	,2476
# Ties	2

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for Glasson TM
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	76,000	8,444
M	9	95,000	10,556

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney U for Glasson TL
Grouping Variable: Sexo

U	22,000
U Prime	59,000
Z-Value	-1,634
P-Value	,1023
Tied Z-Value	-1,751
Tied P-Value	,0799
# Ties	4

One case was omitted due to missing values.

Mann-Whitney Rank Info for Glasson TL
Grouping Variable: Sexo

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
F	9	67,000	7,444
M	9	104,000	11,556

One case was omitted due to missing values.

Tabla 13: Comparativa de los cuadrantes FT en la escala OARSI, score OARSI y escala de Glasson en ratones Perf$^{-/-}$ macho (M) y hembra (F). Test

de U Mann-Whitney. Nivel de significación estadística p=0,05. Resultados estadísticamente significativos (flecha roja) p<0,05. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

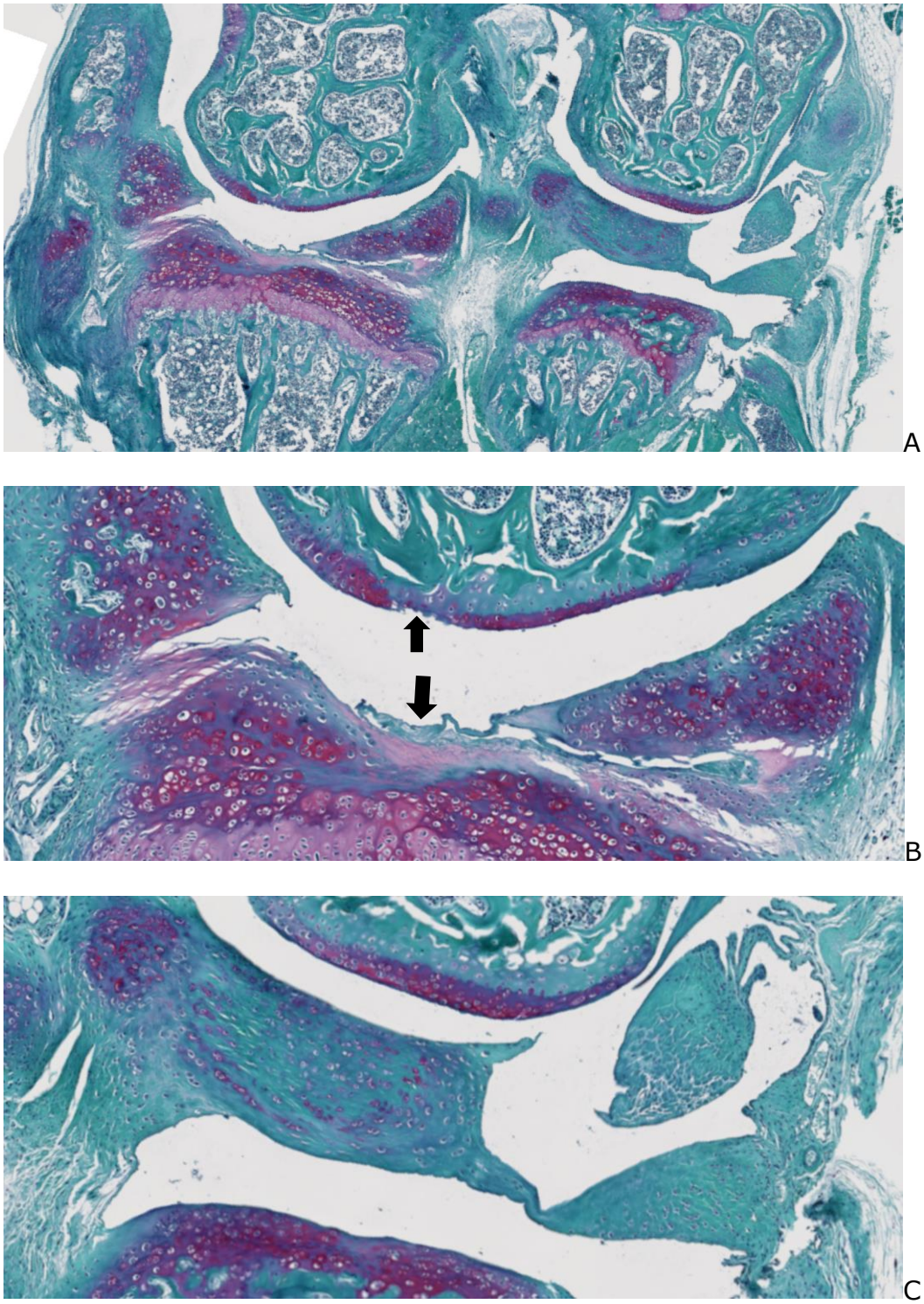


Figura 25: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lado lateral (C) de ratón hembra Perf$^{-/-}$. Escasos cambios degenerativos en el lado lateral con denudación a nivel femoral y tibial (flechas) en el lado medial (B).

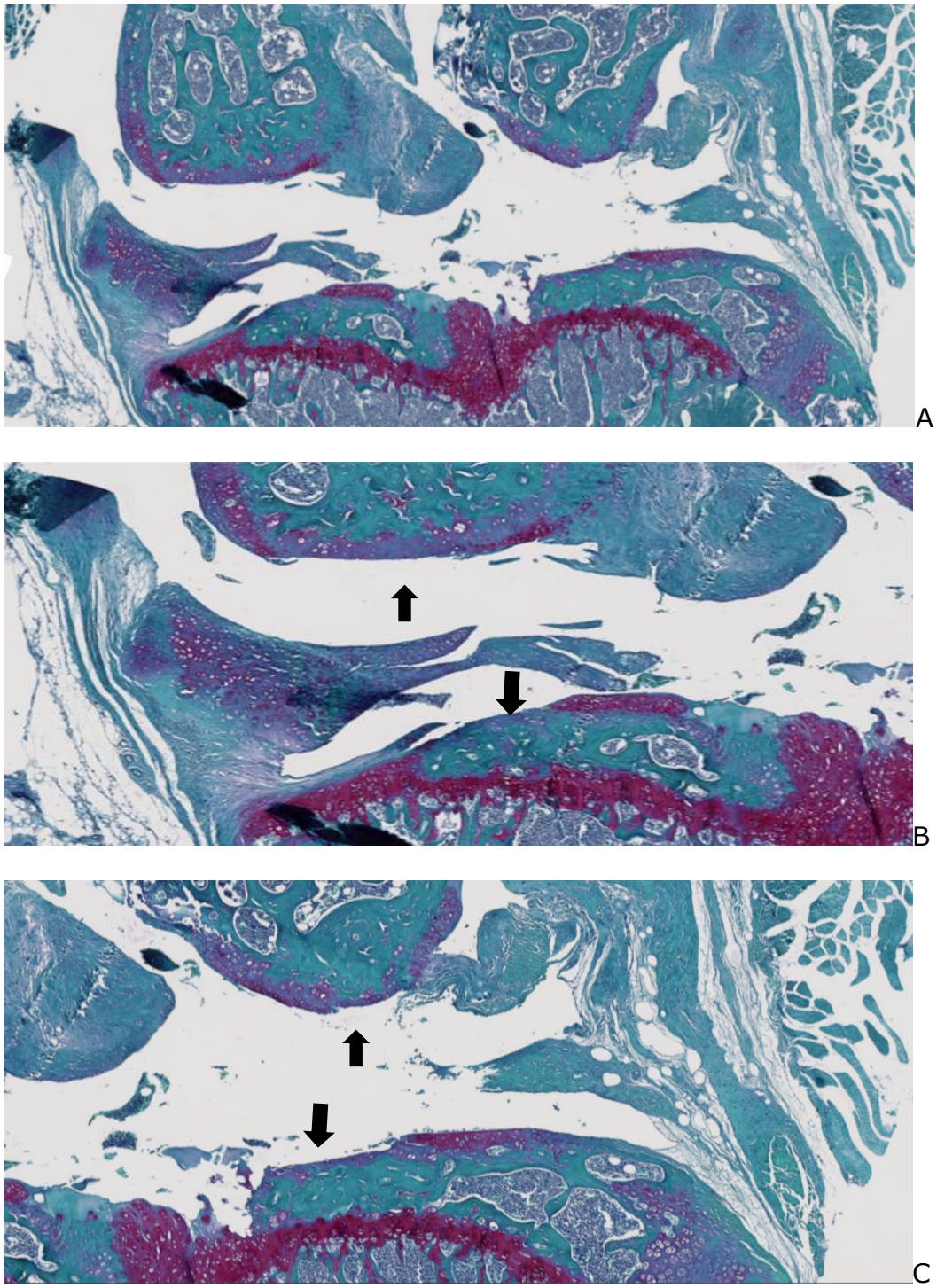


Figura 26: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lado lateral (C) de ratón macho Perf$^{-/-}$ ·Abundantes cambios degenerativos con denudación (flechas) a nivel tibial medial (B) y lateral (C).

PAPEL DE LA GZM A, GZM B Y PERF EN EL DESARROLLO DE ARTROSIS MEDIANTE EL MODELO DMM. RATONES MACHO (M)

Posteriomente se analizó las diferencias en la severidad de la artrosis entre las distintas cepas del mismo sexo incluidas en el estudio para estudiar el papel de gzmA, gzm B y perf en el desarrollo de dicha patología (Fig 27-33 y Tablas 14-19).

Los ratones machos de todos los grupos presentaron valores altos en el estadio OARSI (Figura 27) en las rodillas derechas sin diferencias estadísticamente significativas entre los distinos grupos (control-wt-, gzmA $^{-/-}$, gzmB $^{-/-}$, perf $^{-/-}$). Los ratones macho gzmA $^{-/-}$ mostraron menor desarrollo de artrosis (2,87±0,39) en el estadio OARSI en comparación con otros grupos, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo control (3,33±0,29) (Tabla 14).

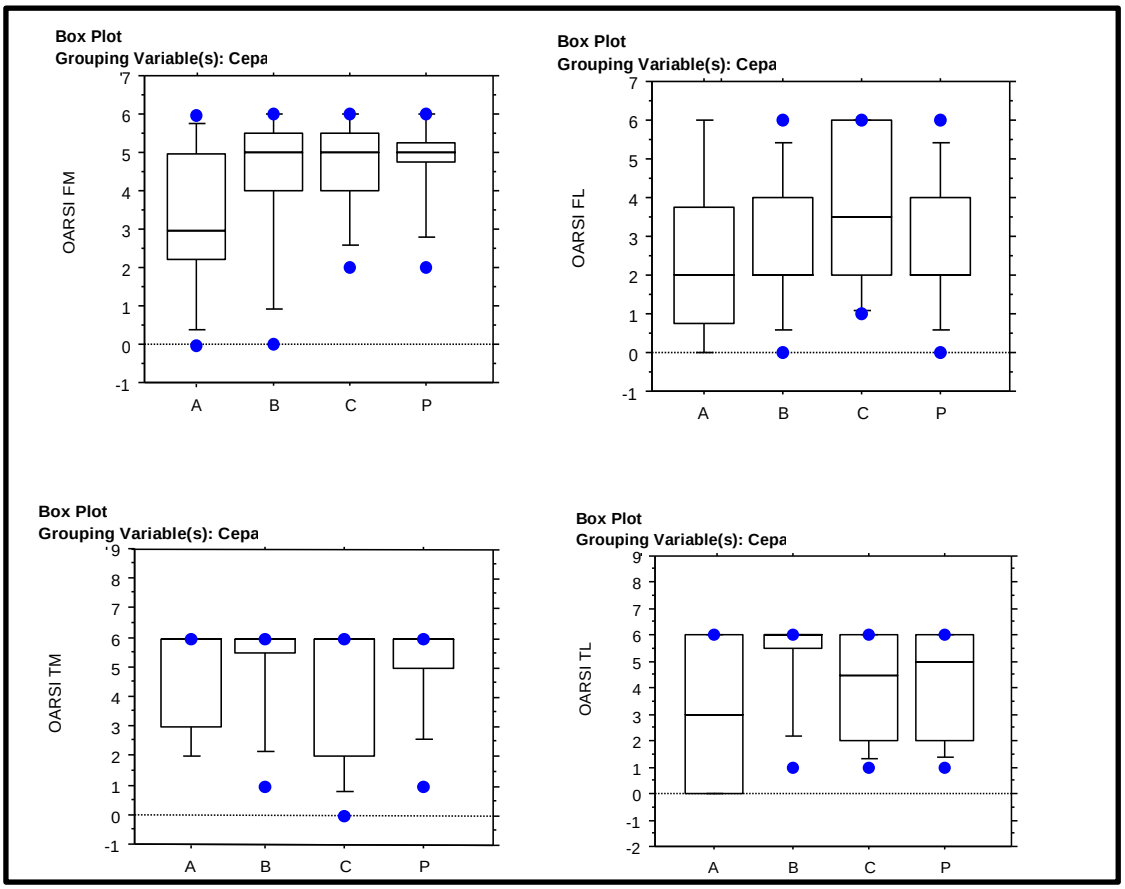


Figura 27: Comparativa en la escala OARSI de los 4 cuadrantes FT de rodillas derechas de las 4 cepas de ratones macho. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-,

atón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

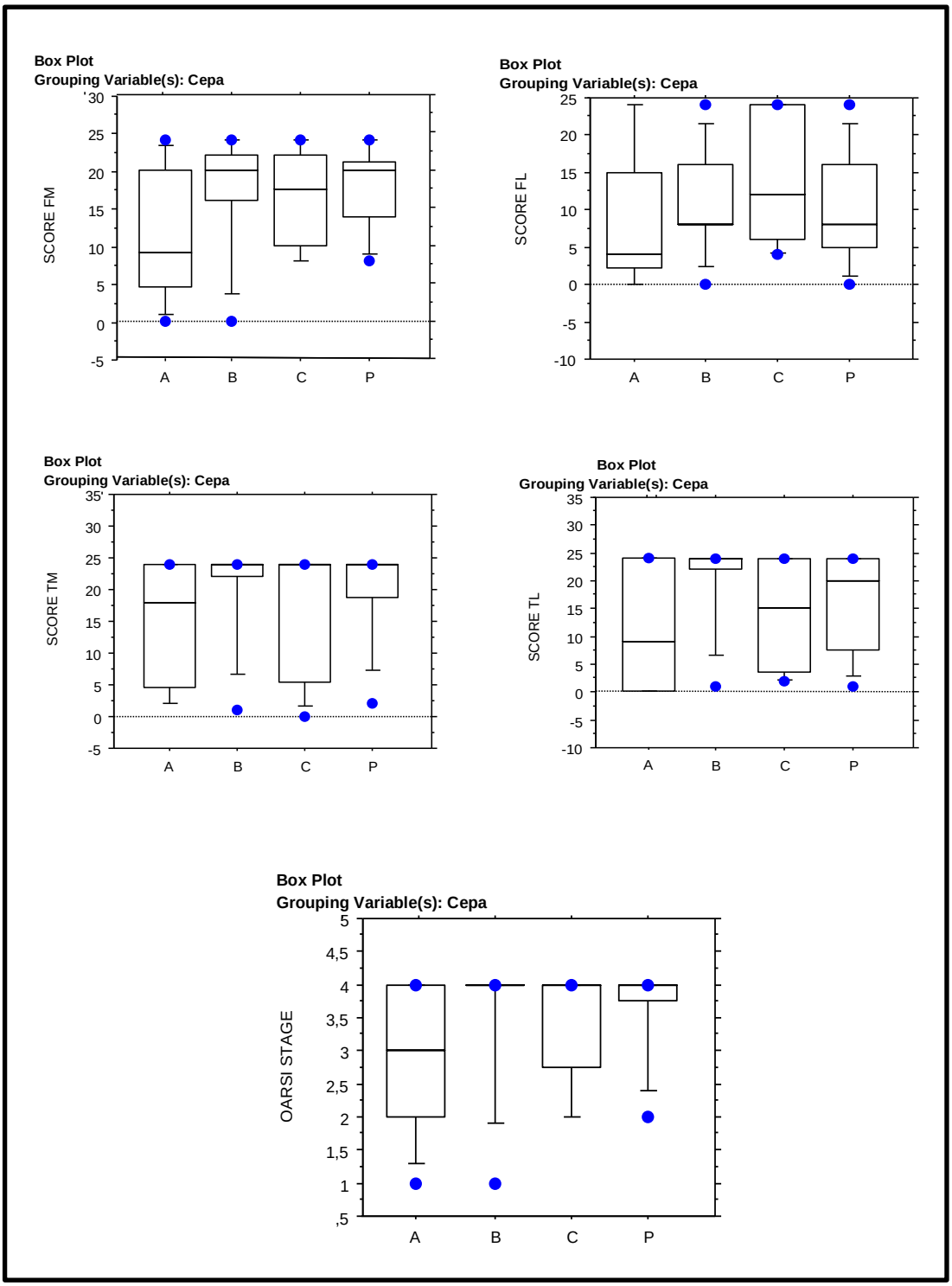


Figura 28: Comparativa en score OARSI (grado x estadio) y estadio OARSI de los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de las 4 cepas de ratones macho. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

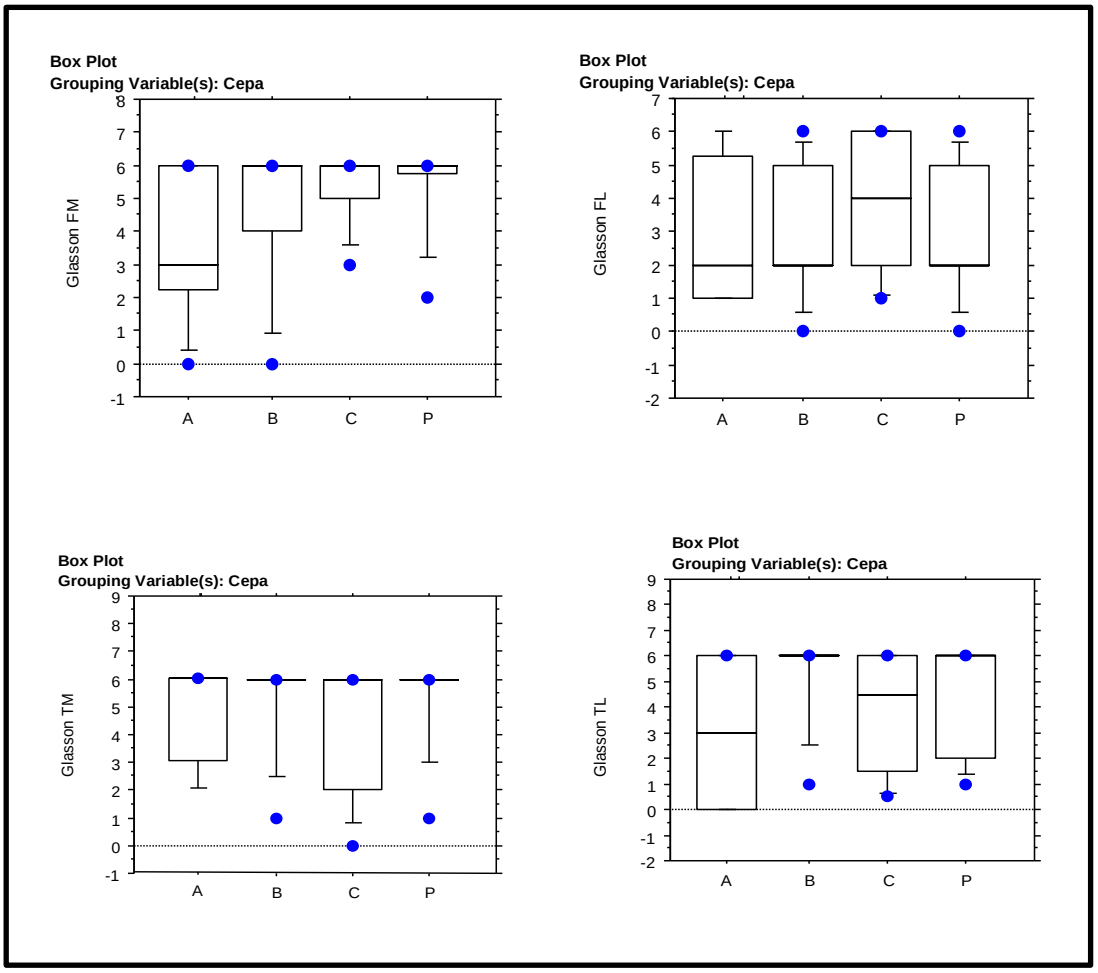


Figura 29: Comparativa en la escala de Glasson de los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de las 4 cepas de ratones macho. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

Los valores más bajos, y por tanto, con menor desarrollo de artrosis, fueron observados en los ratones GzmA$^{-/-}$ y ratones –wt-. A nivel FM, FL y TL los valores más bajos correspondieron a los ratones GzmA$^{-/-}$ con respecto a los demás, aunque dicho valor fue muy similar a los ratones –wt- en la TM incluso con mejores resultados en estos últimos (Tablas 14 y 15). Estas diferencias observadas no alcanzaron significación estadística (Tablas 16-19)

Means Table for OARSI FM
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	7	3,429	2,070	,782
B	8	4,375	1,996	,706
C	8	4,625	1,302	,460
P	9	4,778	1,202	,401

Means Table for OARSI FL
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	5	2,400	2,302	1,030
B	8	2,750	1,832	,648
C	6	3,667	2,066	,843
P	8	2,750	1,832	,648

Means Table for OARSI TM
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	7	4,857	1,952	,738
B	8	5,250	1,753	,620
C	9	4,111	2,369	,790
P	9	5,222	1,641	,547

Means Table for OARSI TL
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	6	3,000	3,286	1,342
B	8	5,250	1,753	,620
C	8	4,000	2,204	,779
P	9	4,333	2,062	,687

Means Table for OARSI STAGE
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	8	2,875	1,126	,398
B	8	3,625	1,061	,375
C	9	3,333	,866	,289
P	9	3,667	,707	,236

Means Table for SCORE FM
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	7	11,857	9,353	3,535
B	8	17,500	7,982	2,822
C	8	16,375	6,589	2,329
P	9	17,444	5,681	1,894

Means Table for SCORE FL
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	5	8,600	9,685	4,331
B	8	11,000	7,329	2,591
C	6	13,667	8,618	3,518
P	8	10,250	7,815	2,763

Means Table for SCORE TM
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	7	15,143	9,990	3,776
B	8	20,625	8,052	2,847
C	9	15,111	10,682	3,561
P	9	20,111	7,457	2,486

Means Table for SCORE TL
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	6	11,000	12,247	5,000
B	8	20,625	8,052	2,847
C	8	13,875	10,882	3,847
P	9	16,778	9,162	3,054

Tabla 14: Valores en la escala OARSI, estadio OARSI y score OARSI en los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de las 4 cepas de ratones macho. Valores expresados en media + error estándar. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

Means Table for Glasson FM
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	7	3,714	2,360	,892
B	8	4,750	2,188	,773
C	8	5,375	1,061	,375
P	9	5,444	1,333	,444

Means Table for Glasson FL
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	5	3,000	2,345	1,049
B	8	3,000	2,070	,732
C	6	3,833	2,137	,872
P	8	3,000	2,070	,732

Means Table for Glasson TM
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	7	4,857	1,952	,738
B	8	5,375	1,768	,625
C	9	4,111	2,369	,790
P	9	5,444	1,667	,556

Means Table for Glasson TL
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	6	3,000	3,286	1,342
B	8	5,375	1,768	,625
C	8	3,813	2,449	,866
P	9	4,556	2,186	,729

Tabla 15: valores en las escala de Glasson en los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de las 4 cepas de ratones macho. Valores expresados en media + error estándar. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral.

Fisher's PLSD for OARSI FM
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-,946	1,795	,2920
A, C	-1,196	1,795	,1848
A, P	-1,349	1,748	,1261
B, C	-,250	1,734	,7716
B, P	-,403	1,685	,6308
C, P	-,153	1,685	,8551

Fisher's PLSD for OARSI FL
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-,350	2,227	,7507
A, C	-1,267	2,366	,2832
A, P	-,350	2,227	,7507
B, C	-,917	2,110	,3824
B, P	0,000	1,953	.
C, P	,917	2,110	,3824

Fisher's PLSD for OARSI TM
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-,393	1,825	,6655
A, C	,746	1,777	,4007
A, P	-,365	1,777	,6798
B, C	1,139	1,713	,1864
B, P	,028	1,713	,9740
C, P	-1,111	1,662	,1840

Fisher's PLSD for OARSI TL
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-2,250	2,555	,0825
A, C	-1,000	2,555	,4325
A, P	-1,333	2,493	,2854
B, C	1,250	2,366	,2910
B, P	,917	2,299	,4240
C, P	-,333	2,299	,7704

Fisher's PLSD for OARSI STAGE
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-,750	,892	,0970
A, C	-,458	,867	,2915
A, P	-,792	,867	,0724
B, C	,292	,867	,5003
B, P	-,042	,867	,9231
C, P	-,333	,841	,4277

Tabla 16: Comparativa de las diferentes cepas de las rodillas derechas (intervenidas) de los ratones macho en escala OARSI y estadio OARSI. Nivel de significación p<0,05. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral.

Fisher's PLSD for SCORE FM
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-5,643	7,911	,1567
A, C	-4,518	7,911	,2544
A, P	-5,587	7,703	,1500
B, C	1,125	7,643	,7670
B, P	,056	7,427	,9880
C, P	-1,069	7,427	,7719

Fisher's PLSD for SCORE FL
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-2,400	9,343	,6041
A, C	-5,067	9,924	,3058
A, P	-1,650	9,343	,7211
B, C	-2,667	8,851	,5434
B, P	,750	8,194	,8531
C, P	3,417	8,851	,4371

Fisher's PLSD for SCORE TM
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-5,482	8,726	,2112
A, C	,032	8,497	,9940
A, P	-4,968	8,497	,2439
B, C	5,514	8,193	,1811
B, P	,514	8,193	,8996
C, P	-5,000	7,948	,2106

Fisher's PLSD for SCORE TL
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-9,625	10,865	,0808
A, C	-2,875	10,865	,5948
A, P	-5,778	10,604	,2765
B, C	6,750	10,059	,1820
B, P	3,847	9,776	,4300
C, P	-2,903	9,776	,5508

Fisher's PLSD for Glasson FM
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-1,036	1,916	,2801
A, C	-1,661	1,916	,0872
A, P	-1,730	1,865	,0681
B, C	-,625	1,851	,4978
B, P	-,694	1,799	,4387
C, P	-,069	1,799	,9380

Fisher's PLSD for Glasson FL
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	0,000	2,421	.
A, C	-,833	2,571	,5135
A, P	0,000	2,421	.
B, C	-,833	2,293	,4642
B, P	0,000	2,123	.
C, P	,833	2,293	,4642

Fisher's PLSD for Glasson TM
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-,518	1,805	,5647
A, C	,746	1,757	,3955
A, P	-,587	1,757	,5028
B, C	1,264	1,694	,1393
B, P	-,069	1,694	,9343
C, P	-1,333	1,644	,1088

Fisher's PLSD for Glasson TL
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-2,375	2,649	,0773
A, C	-,813	2,649	,5378
A, P	-1,556	2,585	,2303
B, C	1,563	2,452	,2045
B, P	,819	2,383	,4901
C, P	-,743	2,383	,5312

Tabla 17: Comparativa de las diferentes cepas de las rodillas derechas (intervenidas) de los ratones hembra en score OARSI y escala Glasson. Test de Fisher. Nivel de significación p<0,05. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

Kruskal-Wallis Test for OARSI FM
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	6
H	2,177
P-Value	,7032
H corrected for ties	2,368
Tied P-Value	,6684

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for OARSI FL
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	6
H	2,149
P-Value	,7084
H corrected for ties	2,314
Tied P-Value	,6782

9 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for OARSI TM
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	4
H	,914
P-Value	,9225
H corrected for ties	1,269
Tied P-Value	,8666

2 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for OARSI FM
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	7	106,000	15,143
B	8	172,500	21,563
C	8	170,000	21,250
P	9	202,500	22,500

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for OARSI FL
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	5	73,000	14,600
B	8	136,000	17,000
C	6	129,500	21,583
P	8	136,000	17,000

9 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for OARSI TM
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	7	158,500	22,643
B	8	192,000	24,000
C	9	167,500	18,611
P	9	204,500	22,722

2 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for OARSI TL
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	5
H	2,110
P-Value	,7156
H corrected for ties	2,575
Tied P-Value	,6313

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for OARSI TL
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	5
H	2,110
P-Value	,7156
H corrected for ties	2,575
Tied P-Value	,6313

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for OARSI STAGE
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	4
H	4,690
P-Value	,3206
H corrected for ties	7,254
Tied P-Value	,1230

One case was omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for OARSI TL
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	6	97,500	16,250
B	8	203,000	25,375
C	8	162,500	20,313
P	9	181,500	20,167

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for OARSI TL
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	6	97,500	16,250
B	8	203,000	25,375
C	8	162,500	20,313
P	9	181,500	20,167

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for OARSI STAGE
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	8	121,500	15,188
B	8	204,500	25,563
C	9	178,000	19,778
P	9	219,500	24,389

One case was omitted due to missing values.

Tabla 18: Comparativa entre las distintas cepas de las rodillas derechas (intervenida) de ratones macho en la escala OARSI y estadio OARSI. Test de Kruskal Wallis. Nivel de significación p<0,05. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

Kruskal-Wallis Test for SCORE FM
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	7
H	2,713
P-Value	,6070
H corrected for ties	2,862
Tied P-Value	,5812

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for SCORE FL
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	7
H	2,477
P-Value	,6487
H corrected for ties	2,550
Tied P-Value	,6357

9 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for SCORE TM
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	4
H	2,145
P-Value	,7092
H corrected for ties	2,759
Tied P-Value	,5989

2 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for SCORE FM
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	7	104,500	14,929
B	8	182,000	22,750
C	8	162,000	20,250
P	9	193,500	21,500

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for SCORE FL
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	5	67,000	13,400
AB	9	194,000	21,556
B	8	147,000	18,375
C	6	125,000	20,833
P	8	133,000	16,625

9 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for SCORE TM
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	7	121,500	17,357
B	8	200,000	25,000
C	9	174,500	19,389
P	9	213,000	23,667

2 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for SCORE TL
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	7
H	3,623
P-Value	,4594
H corrected for ties	4,294
Tied P-Value	,3676

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for Glasson FM
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	5
H	2,149
P-Value	,7083
H corrected for ties	2,896
Tied P-Value	,5753

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for Glasson FL
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	6
H	1,908
P-Value	,7527
H corrected for ties	2,068
Tied P-Value	,7233

9 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for SCORE TL
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	6	83,500	13,917
B	8	206,000	25,750
C	8	158,000	19,750
P	9	187,500	20,833

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for Glasson FM
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	7	109,000	15,571
B	8	165,500	20,688
C	8	177,000	22,125
P	9	217,500	24,167

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for Glasson FL
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	5	78,000	15,600
B	8	134,000	16,750
C	6	127,000	21,167
P	8	134,000	16,750

9 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for Glasson TM
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	3
H	2,345
P-Value	,6727
H corrected for ties	4,643
Tied P-Value	,3260

2 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for Glasson TL
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	4
H	2,871
P-Value	,5796
H corrected for ties	4,033
Tied P-Value	,4016

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for Glasson TM
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	7	143,500	20,500
B	8	188,000	23,500
C	9	152,500	16,944
P	9	214,500	23,833

2 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for Glasson TL
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	6	91,500	15,250
B	8	203,500	25,438
C	8	150,000	18,750
P	9	198,500	22,056

4 cases were omitted due to missing values.

Tabla 19: Comparativa entre las distintas cepas de las rodillas derechas (intervenida) de ratones macho en score OARSI y escala Glasson. Test de

Kruskal Wallis. Nivel de significación p<0,05. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

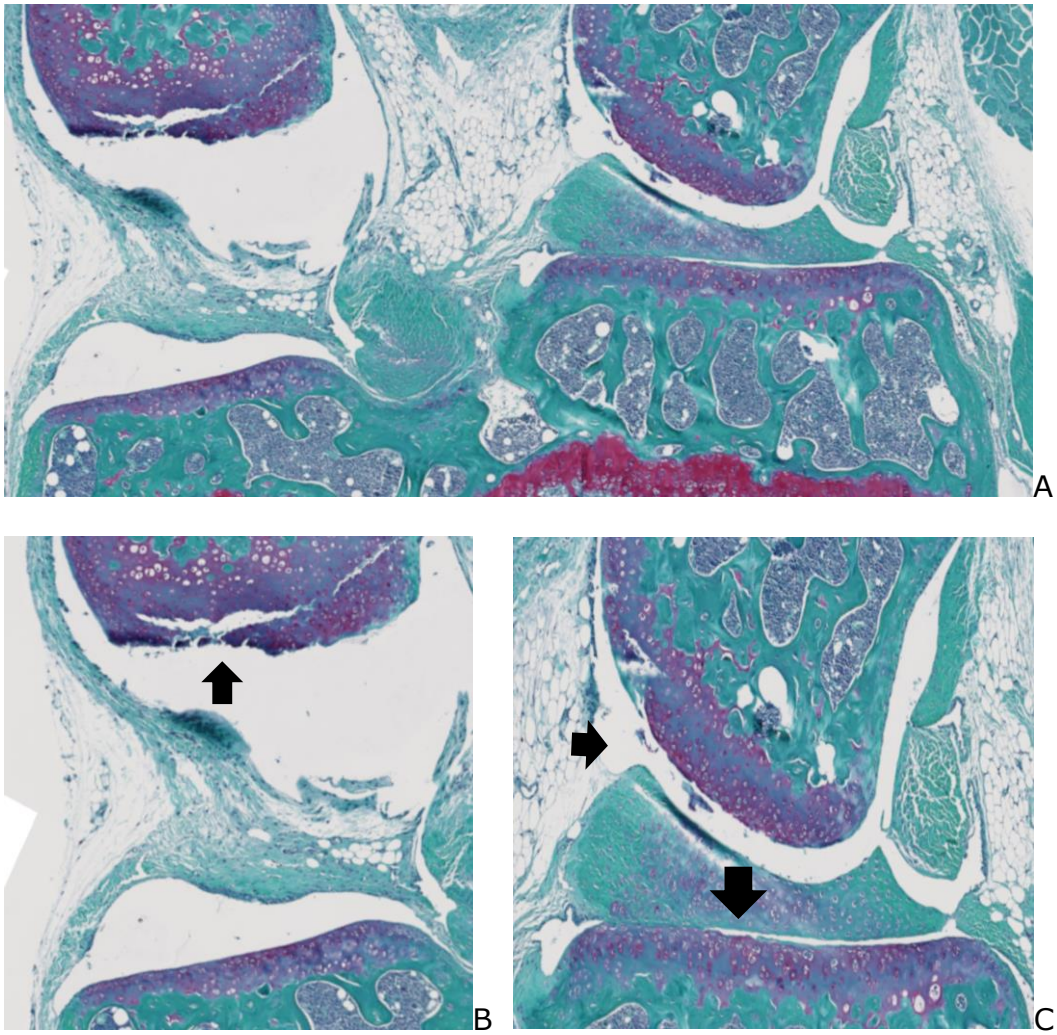


Figura 30: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lateral (C) de ratón –wt- macho. En el lado medial (B) erosiones en FM (flechas) con TM bastante bien conservada. En lado lateral (C) rugosidades en TL y fisuras en FL (flechas).

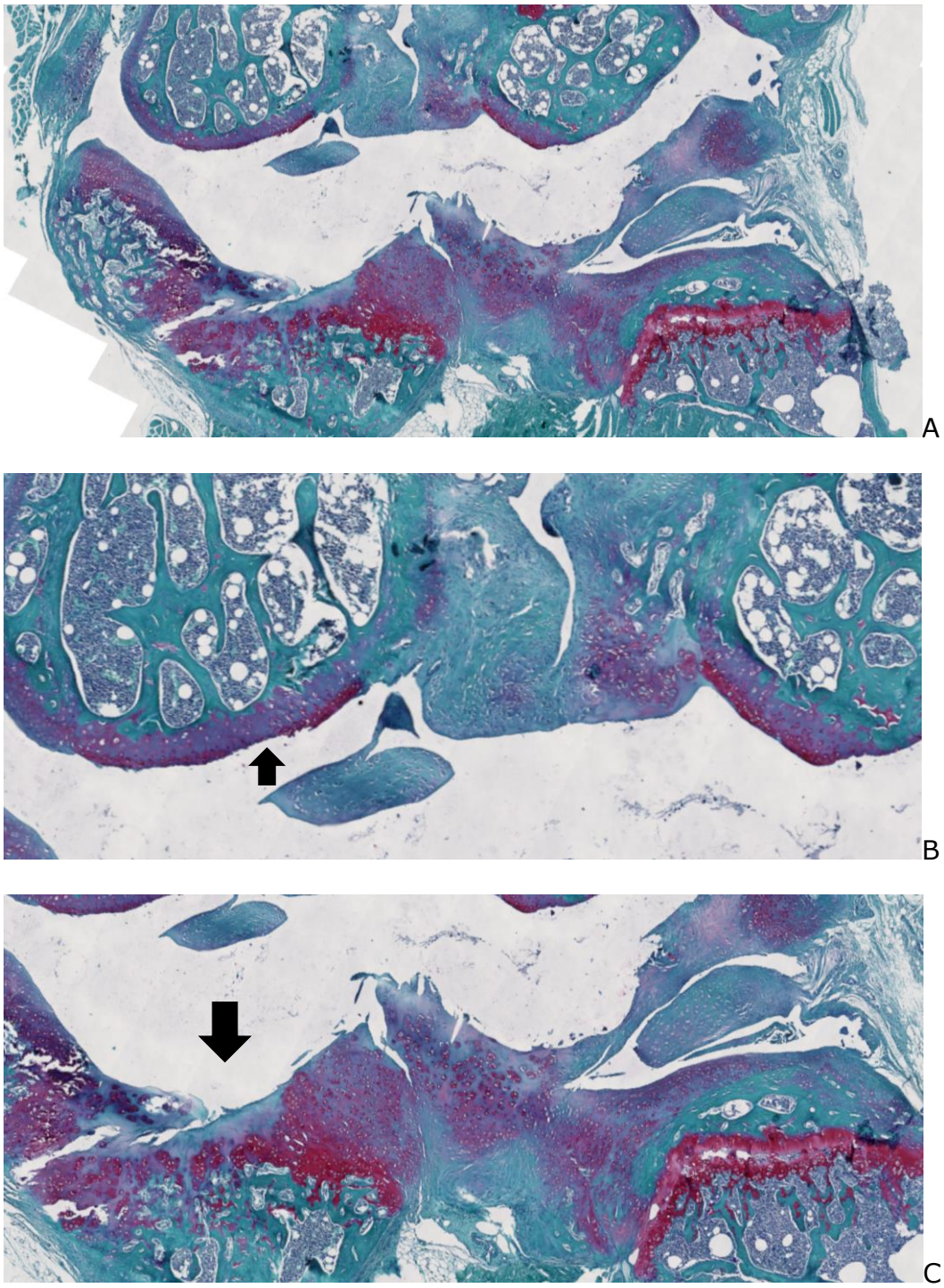


Figura 31: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado femoral (B) y tibial (C) de ratón GzmA$^{-/-}$ macho. En el lado femoral (B) erosiones superficiales en FM (flecha) con FL bastante bien conservado. En lado tibial (C) pérdida de cartílago hasta hueso en TM (flecha) y conservación de TL (flechas).

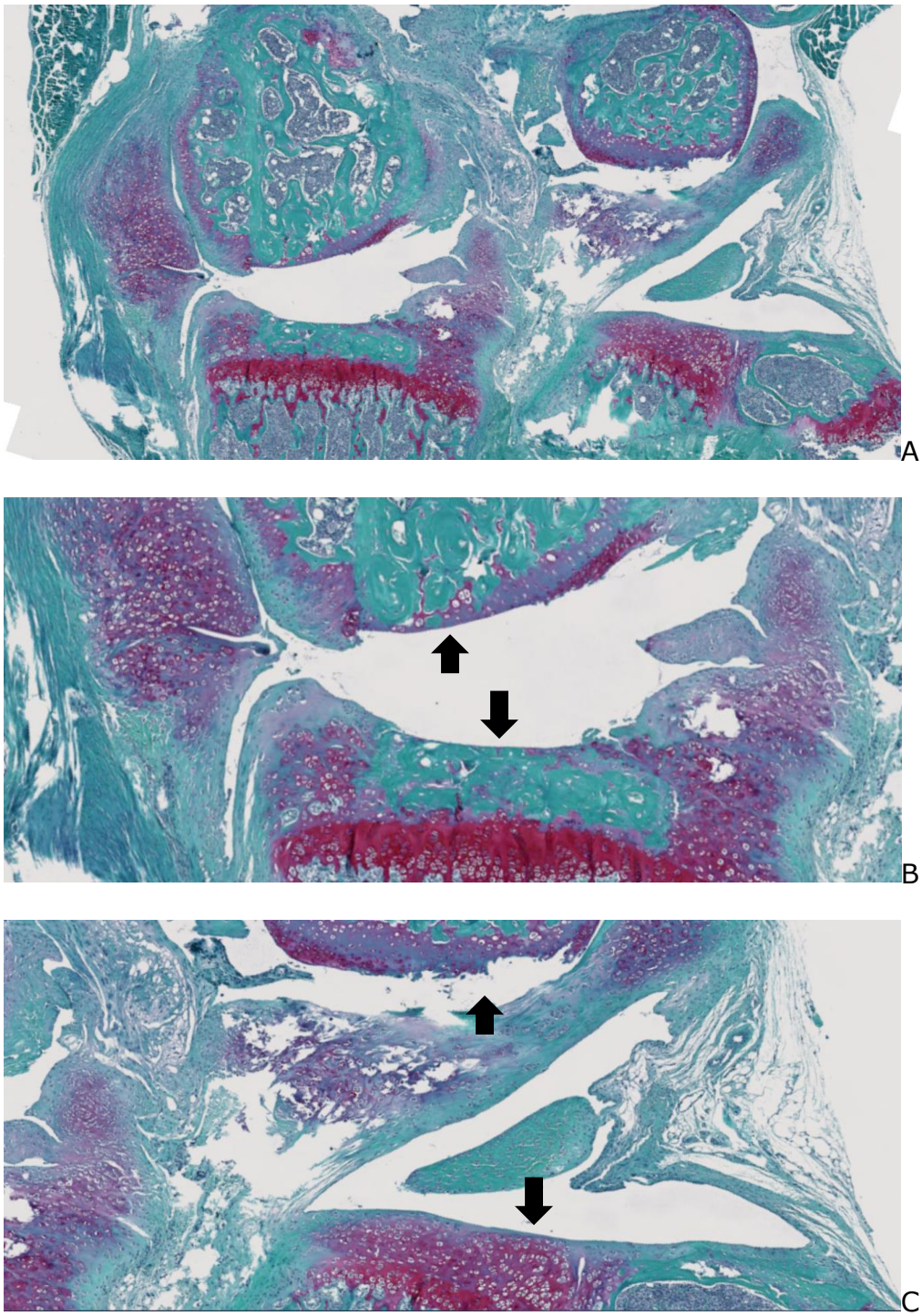


Figura 32: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lateral (C) de ratón GzmB$^{-/-}$ macho. En el lado medial (B) erosiones hasta hueso subcondral en FM y TM (flechas). En lado lateral (C) erosiones superficiales en FL y TL (flechas).

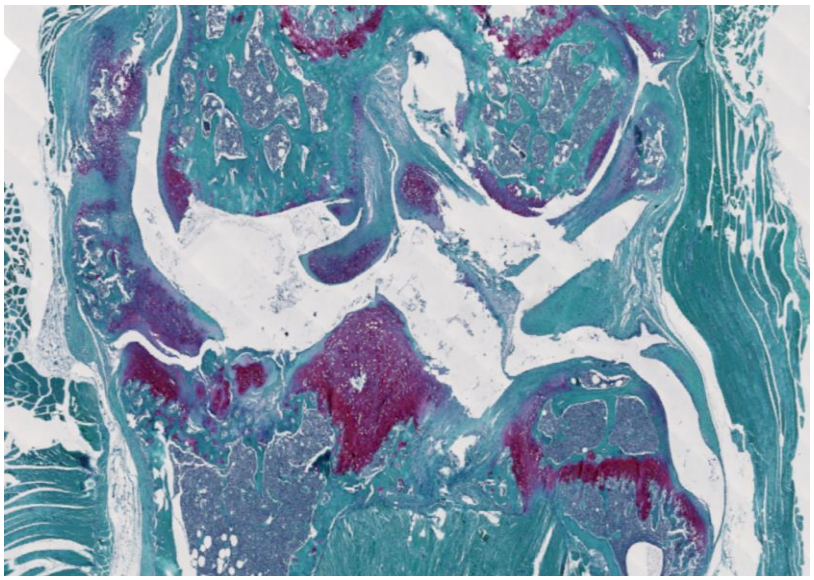


Figura 33: Corte histológico de rodilla derecha de ratón Perf$^{-/-}$ macho. Se aprecia importante desestructuración y artrosis en los cuatro cuadrantes femorotibiales

PAPEL DE LA GZM A, GZM B Y PERF EN EL DESARROLLO DE ARTROSIS MEDIANTE EL MODELO DMM. RATONES HEMBRA (F)

Tras el estudio de los resultados obtenidos por el grupo de ratones macho, se realizó el estudio de los ratones hembra.

Los ratones hembra deficientes en GzmA y GzmB mostraron una artrosis menos severa que los ratones control y deficientes en perforina del mismo sexo. Los ratones hembra del grupo control mostraron los peores resultados. Se observaron menos cambios degenerativos en el estadio OARSI en los ratones hembra GzmA -/- y Gzm B-/-, pero especialmente en los deficientes en GzmA, respecto al grupo control, de forma estadísticamente significativa ($p<0,05$) (Figuras 34-40, Tablas 20-25).

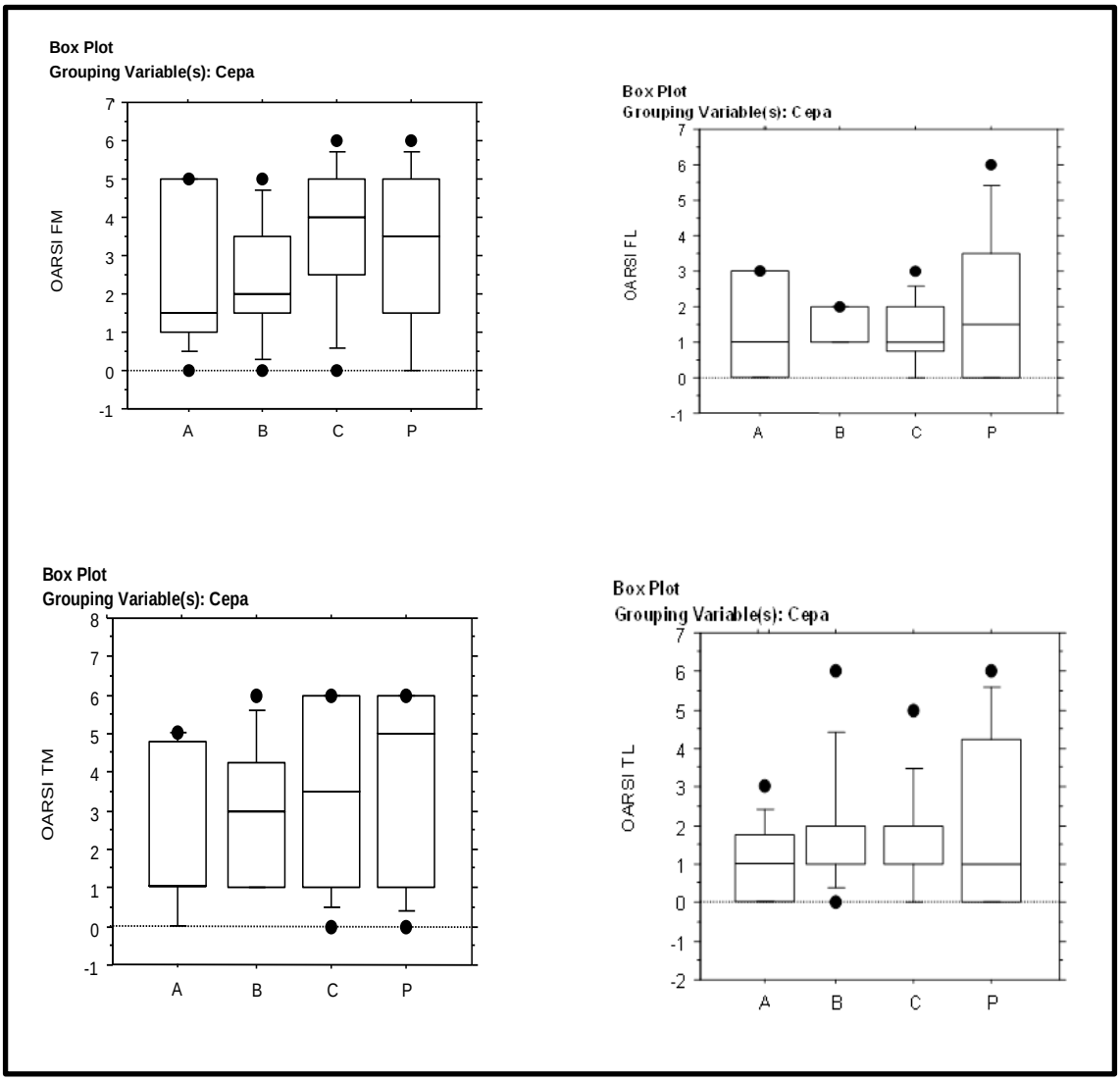


Figura 34: Comparativa en escala OARSI de los 4 cuadrantes FT de rodillas derechas de ratones hembra. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-.

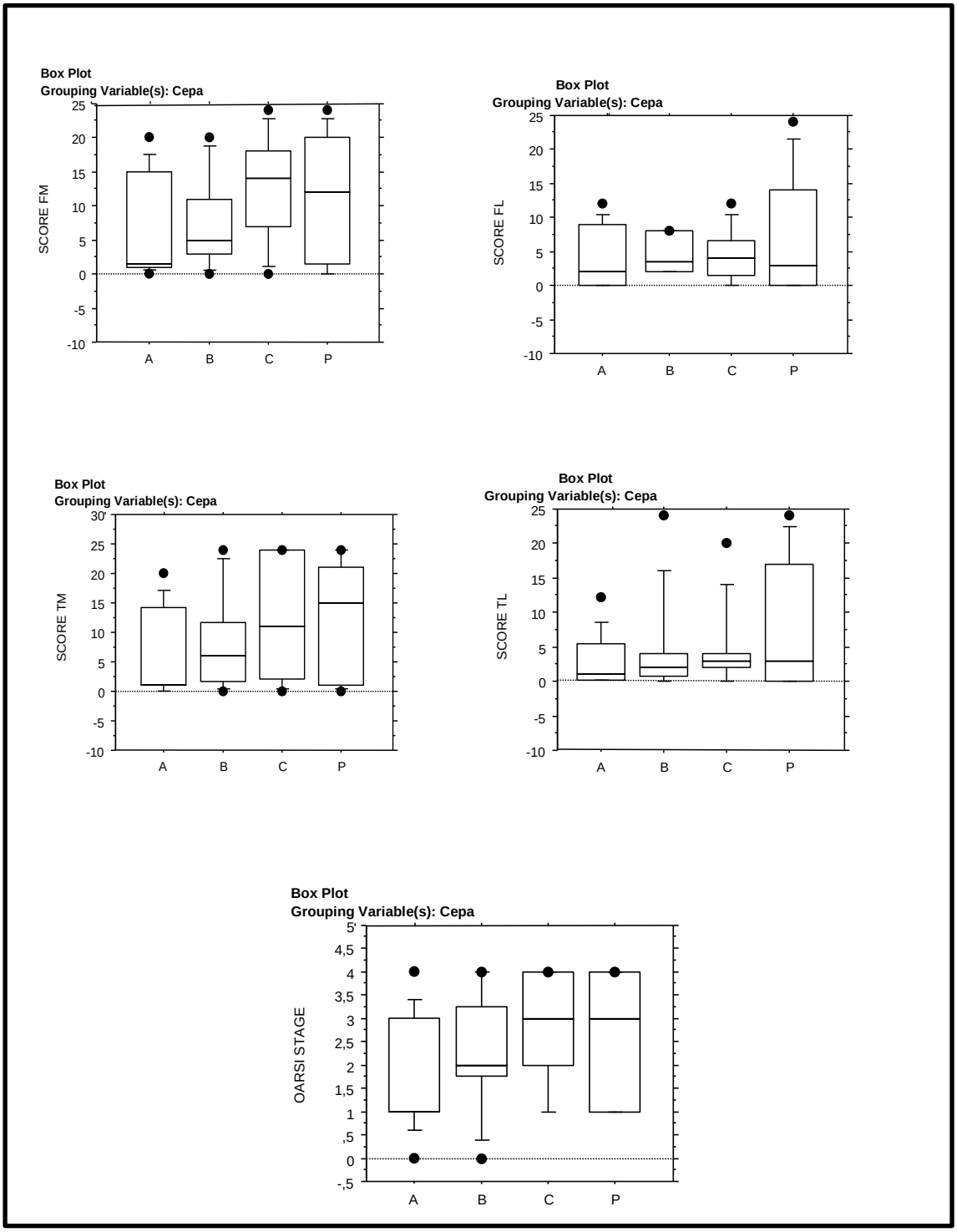


Figura 35: Comparativa en score OARSI (grado x estadio) y estadio OARSI de los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de ratones hembra. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-

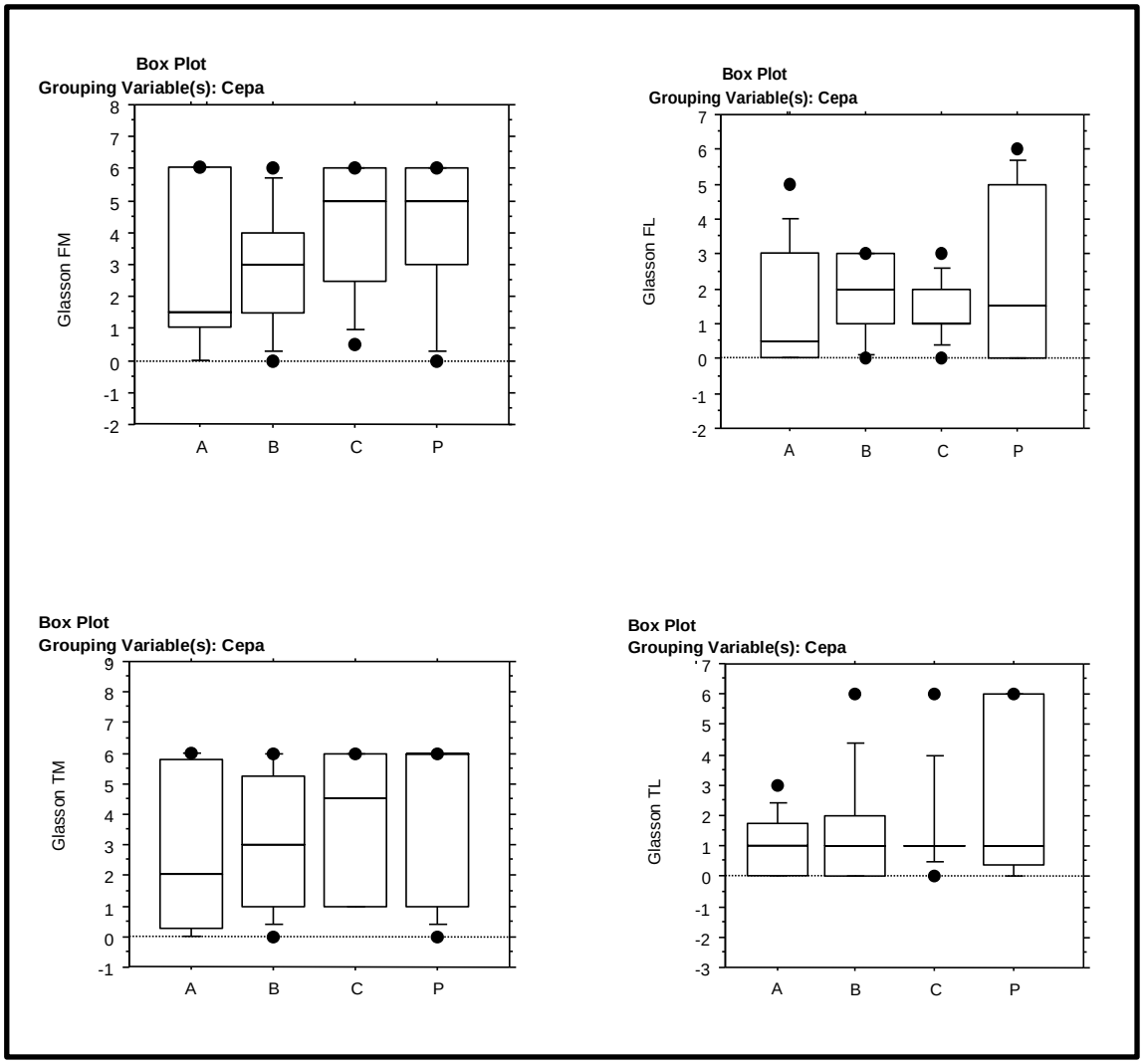


Figura 36: Comparativa en la escala de Glasson de los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de ratones hembra. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral.

Means Table for OARSI FM
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	9	2,778	2,167	,722
B	6	2,333	1,862	,760
C	8	3,625	1,923	,680
P	8	3,250	2,252	,796

Means Table for OARSI TM
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	9	2,333	2,179	,726
B	6	3,333	2,066	,843
C	8	4,125	1,959	,693
P	8	3,625	2,504	,885

Means Table for OARSI FL
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	9	1,222	1,394	,465
B	6	1,667	,516	,211
C	8	1,500	,926	,327
P	8	2,000	2,204	,779

Means Table for OARSI TL
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	9	1,000	1,118	,373
B	6	2,000	2,000	,816
C	8	1,500	1,512	,535
P	8	2,500	2,330	,824

Means Table for OARSI STAGE
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	9	1,889	1,364	,455
B	6	2,667	1,211	,494
C	8	3,250	1,035	,366
P	8	2,750	1,488	,526

Means Table for SCORE FM
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	9	7,778	8,197	2,732
B	6	8,000	8,099	3,307
C	8	12,750	7,996	2,827
P	8	11,375	9,546	3,375

Means Table for SCORE FL
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	9	3,778	4,842	1,614
B	6	4,500	2,811	1,147
C	8	5,000	3,703	1,309
P	8	7,250	9,067	3,206

Means Table for SCORE TM
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	9	6,889	7,960	2,653
B	6	10,667	9,416	3,844
C	8	14,500	8,992	3,179
P	8	13,125	10,696	3,782

Means Table for SCORE TL
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	9	2,889	4,226	1,409
B	6	6,333	8,733	3,565
C	8	5,500	6,302	2,228
P	8	8,750	9,662	3,416

Tabla 20: Valores en la escala OARSI, estadio OARSI y score OARSI en los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de ratones hembra. Valores expresado en media + error estándar. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –

wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral.

Means Table for Glasson TM
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	9	2,778	2,587	,862
B	6	3,833	2,639	1,078
C	8	4,375	2,326	,822
P	8	4,000	2,777	,982

Means Table for Glasson TL
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	9	1,000	1,118	,373
B	6	1,667	2,251	,919
C	8	1,500	1,852	,655
P	8	2,938	2,678	,947

Means Table for Glasson FM
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	9	3,222	2,682	,894
B	6	3,000	2,280	,931
C	8	4,188	2,103	,744
P	8	4,250	2,375	,840

Means Table for Glasson FL
Effect: Cepa

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
A	9	1,333	1,871	,624
B	6	1,833	1,169	,477
C	8	1,500	,926	,327
P	8	2,375	2,560	,905

Tabla 21: Valores en la escala de Glasson en los 4 cuadrantes FT de las rodillas derechas de los ratones hembra. Valores expresados en media + error estándar. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral.

Fisher's PLSD for OARSI FM
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	,444	2,059	,6632
A, C	-,847	1,899	,3702
A, P	-,472	1,899	,6159
B, C	-1,292	2,110	,2215
B, P	-,917	2,110	,3829
C, P	,375	1,954	,6984

Fisher's PLSD for OARSI FL
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-,444	1,473	,5431
A, C	-,278	1,358	,6797
A, P	-,778	1,358	,2519
B, C	,167	1,509	,8234
B, P	-,333	1,509	,6558
C, P	-,500	1,397	,4713

Fisher's PLSD for OARSI TM
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-1,000	2,377	,3979
A, C	-1,792	2,192	,1057
A, P	-1,292	2,192	,2388
B, C	-,792	2,436	,5127
B, P	-,292	2,436	,8089
C, P	,500	2,255	,6546

Fisher's PLSD for OARSI TL
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-1,000	2,051	,3282
A, C	-,500	1,891	,5939
A, P	-1,500	1,891	,1160
B, C	,500	2,102	,6313
B, P	-,500	2,102	,6313
C, P	-1,000	1,946	,3031

Fisher's PLSD for OARSI STAGE
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
A, B	-,778	1,316	,2373	
A, C	-1,361	1,213	,0290	S
A, P	-,861	1,213	,1579	
B, C	-,583	1,348	,3847	
B, P	-,083	1,348	,9006	
C, P	,500	1,248	,4205	

Tabla 22: Comparativa de rodillas derechas (intervenidas) de las diferentes cepas de los ratones hembra en escala OARSI y estadio OARSI. Test de Fisher. Nivel de significación p<0,05. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral.

Fisher's PLSD for SCORE FM
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-,222	8,395	,9573
A, C	-4,972	7,740	,2000
A, P	-3,597	7,740	,3509
B, C	-4,750	8,603	,2691
B, P	-3,375	8,603	,4301
C, P	1,375	7,965	,7274

Fisher's PLSD for SCORE FL
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-,722	5,850	,8030
A, C	-1,222	5,393	,6475
A, P	-3,472	5,393	,1990
B, C	-,500	5,994	,8661
B, P	-2,750	5,994	,3570
C, P	-2,250	5,549	,4150

Fisher's PLSD for SCORE TM
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-3,778	9,873	,4415
A, C	-7,611	9,102	,0982
A, P	-6,236	9,102	,1725
B, C	-3,833	10,117	,4459
B, P	-2,458	10,117	,6240
C, P	1,375	9,366	,7669

Fisher's PLSD for SCORE TL
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-3,444	8,300	,4042
A, C	-2,611	7,652	,4920
A, P	-5,861	7,652	,1285
B, C	,833	8,505	,8431
B, P	-2,417	8,505	,5668
C, P	-3,250	7,874	,4067

Fisher's PLSD for Glasson FM
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	,222	2,365	,8495
A, C	-,965	2,181	,3740
A, P	-1,028	2,181	,3443
B, C	-1,188	2,424	,3258
B, P	-1,250	2,424	,3014
C, P	-,063	2,244	,9551

Fisher's PLSD for Glasson FL
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-,500	1,822	,5801
A, C	-,167	1,680	,8411
A, P	-1,042	1,680	,2158
B, C	,333	1,867	,7185
B, P	-,542	1,867	,5588
C, P	-,875	1,729	,3103

Fisher's PLSD for Glasson TM
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-1,056	2,734	,4375
A, C	-1,597	2,521	,2061
A, P	-1,222	2,521	,3308
B, C	-,542	2,802	,6964
B, P	-,167	2,802	,9043
C, P	,375	2,594	,7703

Fisher's PLSD for Glasson TL
Effect: Cepa
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
A, B	-,667	2,284	,5564
A, C	-,500	2,106	,6320
A, P	-1,938	2,106	,0701
B, C	,167	2,341	,8856
B, P	-1,271	2,341	,2770
C, P	-1,438	2,167	,1861

Tabla 23: Comparativa de rodillas derechas (intervenidas) de las diferentes cepas de los ratones hembra en score OARSI y escala Glasson. Test de Fisher. Nivel de significación p<0,05. A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral.

Kruskal-Wallis Test for OARSI FM
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	7
H	3,163
P-Value	,5309
H corrected for ties	3,257
Tied P-Value	,5157

6 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for OARSI FM
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	10	211,000	21,100
B	8	159,000	19,875
C	8	225,000	28,125
P	8	204,500	25,563

6 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for OARSI FL
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	4
H	1,079
P-Value	,8976
H corrected for ties	1,149
Tied P-Value	,8865

9 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for OARSI FL
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	10	184,500	18,450
B	6	146,000	24,333
C	9	183,500	20,389
P	8	180,500	22,563

9 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for OARSI TM
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	6
H	3,021
P-Value	,5543
H corrected for ties	3,143
Tied P-Value	,5342

2 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for OARSI TM
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	11	213,000	19,364
B	9	204,000	22,667
C	10	266,500	26,650
P	9	265,000	29,444

2 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for OARSI TL
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	6
H	2,344
P-Value	,6728
H corrected for ties	2,521
Tied P-Value	,6408

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for OARSI TL
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	11	205,000	18,636
B	9	226,000	25,111
C	10	230,000	23,000
P	9	228,500	25,389

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for OARSI STAGE
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	5
H	4,087
P-Value	,3943
H corrected for ties	4,337
Tied P-Value	,3623

2 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for OARSI STAGE
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	11	201,000	18,273
B	9	198,000	22,000
C	10	280,500	28,050
P	9	238,500	26,500

2 cases were omitted due to missing values.

Tabla 24: Comparativa de rodillas derechas (intervenidas) de las diferentes cepas de los ratones hembra en escala OARSI y estadio OARSI. Test de Kruskal Wallis. Nivel de significación p<0,05 (P-Value). A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral.

Kruskal-Wallis Test for SCORE FM
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	11
H	3,684
P-Value	,4505
H corrected for ties	3,717
Tied P-Value	,4456

7 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for SCORE FM
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	10	175,500	17,550
B	8	167,000	20,875
C	8	225,000	28,125
P	8	195,500	24,438

7 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for SCORE FL
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	8
H	,836
P-Value	,9336
H corrected for ties	,863
Tied P-Value	,9298

9 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for SCORE FL
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	10	184,500	18,450
B	6	138,000	23,000
C	9	199,500	22,167
P	8	178,000	22,250

9 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for SCORE TM
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	8
H	3,080
P-Value	,5445
H corrected for ties	3,128
Tied P-Value	,5367

2 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for SCORE TM
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	11	211,000	19,182
B	9	200,500	22,278
C	10	277,000	27,700
P	9	254,500	28,278

2 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for SCORE TL
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	8
H	2,442
P-Value	,6551
H corrected for ties	2,530
Tied P-Value	,6393

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for SCORE TL
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	11	205,500	18,682
B	9	203,000	22,556
C	10	248,500	24,850
P	9	231,000	25,667

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for Glasson FM
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	6
H	4,228
P-Value	,3761
H corrected for ties	4,379
Tied P-Value	,3572

6 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for Glasson FM
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	10	208,500	20,850
B	8	167,500	20,938
C	8	221,500	27,688
P	8	218,000	27,250

6 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for Glasson FL
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	5
H	1,482
P-Value	,8298
H corrected for ties	1,563
Tied P-Value	,8154

9 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for Glasson FL
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	10	174,500	17,450
B	6	145,000	24,167
C	9	190,000	21,111
P	8	182,500	22,813

9 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for Glasson TM
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	5
H	2,695
P-Value	,6100
H corrected for ties	2,978
Tied P-Value	,5615

2 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for Glasson TM
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	11	221,000	20,091
B	9	195,000	21,667
C	10	267,000	26,700
P	9	260,500	28,944

2 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Test for Glasson TL
Grouping Variable: Cepa

DF	4
# Groups	4
# Ties	5
H	2,595
P-Value	,6276
H corrected for ties	2,831
Tied P-Value	,5866

4 cases were omitted due to missing values.

Kruskal-Wallis Rank Info for Glasson TL
Grouping Variable: Cepa

	Count	Sum Ranks	Mean Rank
A	11	207,500	18,864
B	9	199,000	22,111
C	10	241,500	24,150
P	9	238,500	26,500

4 cases were omitted due to missing values.

Tabla 25: Comparativa de rodillas derechas (intervenidas) de las diferentes cepas de los ratones hembra en score OARSI y escala Glasson. Test de Kruskal Wallis. Nivel de significación p<0,05 (P-Value). A: gzmA-/-; B: gzmB-/-, C: ratón –wt-, P: perf-/-. FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral.

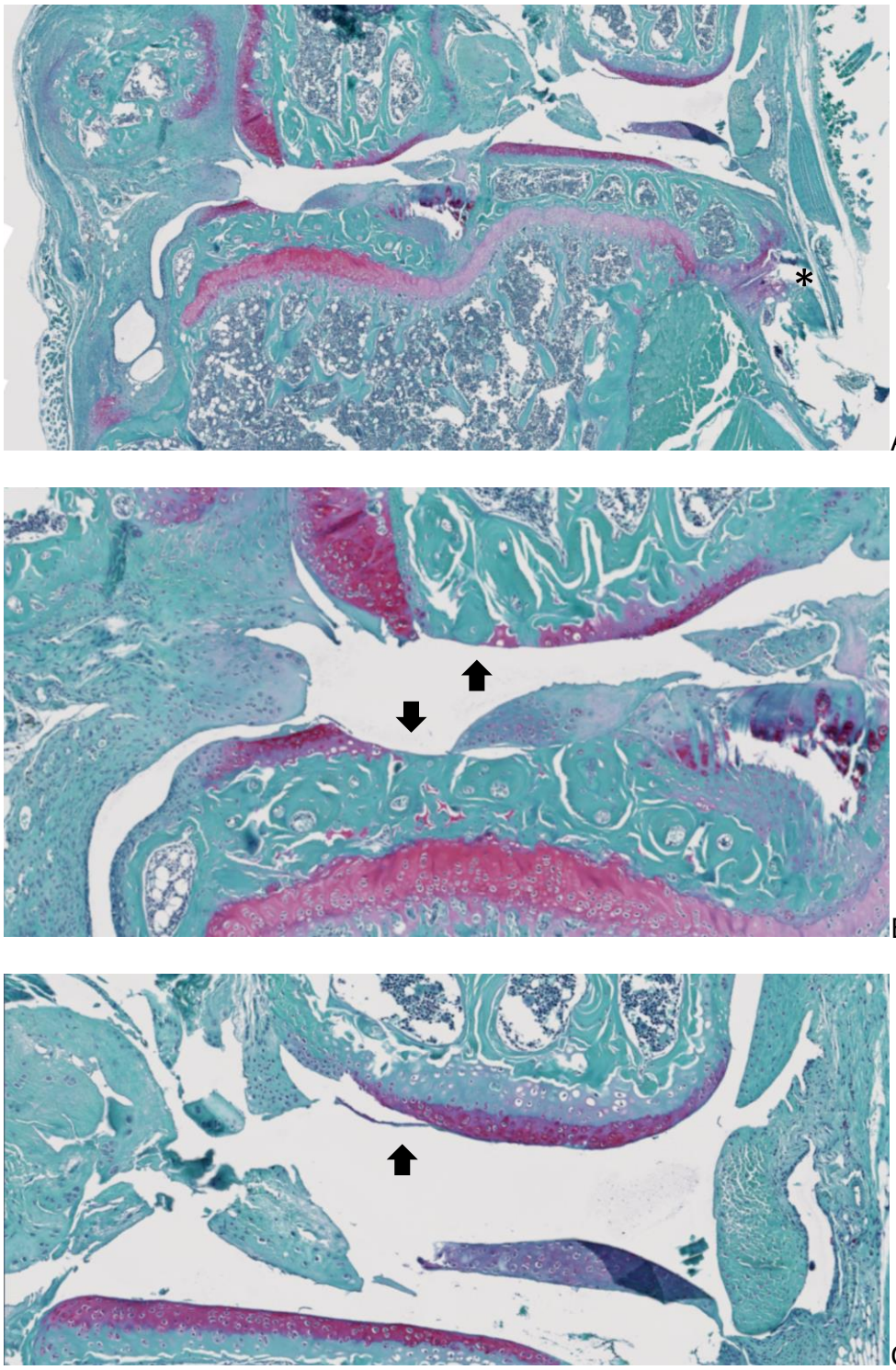


Figura 37: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lateral (C) de ratón –wt- hembra. Articulación tibioperonea (*). En el lado medial (B) erosiones en FM y TM (flechas). En lado lateral (C) rugosidades en FL (flecha).

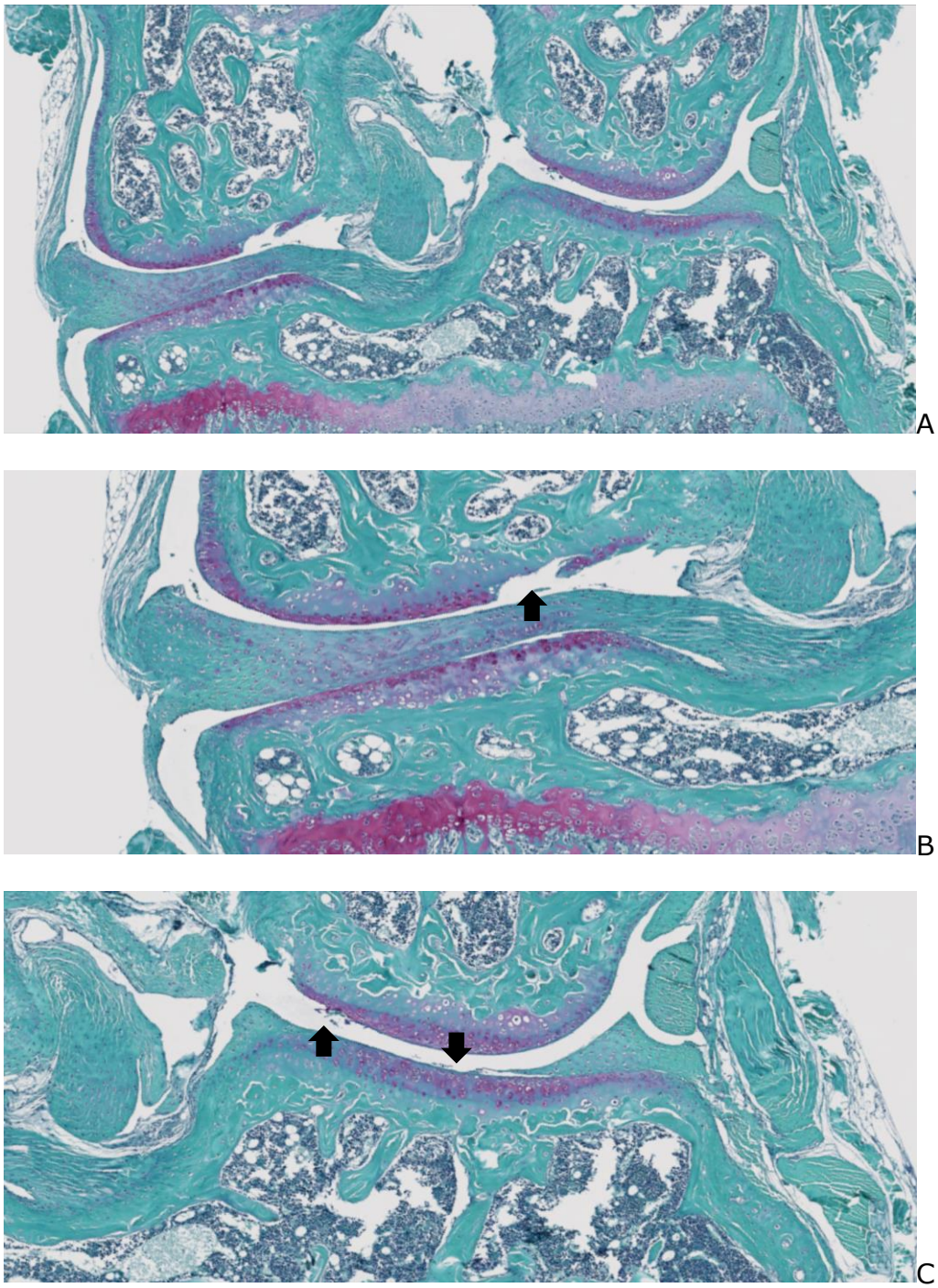


Figura 38: Corte histológico de rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lateral (C) de ratón GzmA$^{-/-}$ hembra. En el lado medial (B) erosiones subcondral profunda en FM (flecha). En lado lateral (C) rugosidades en FL y TL (flechas).

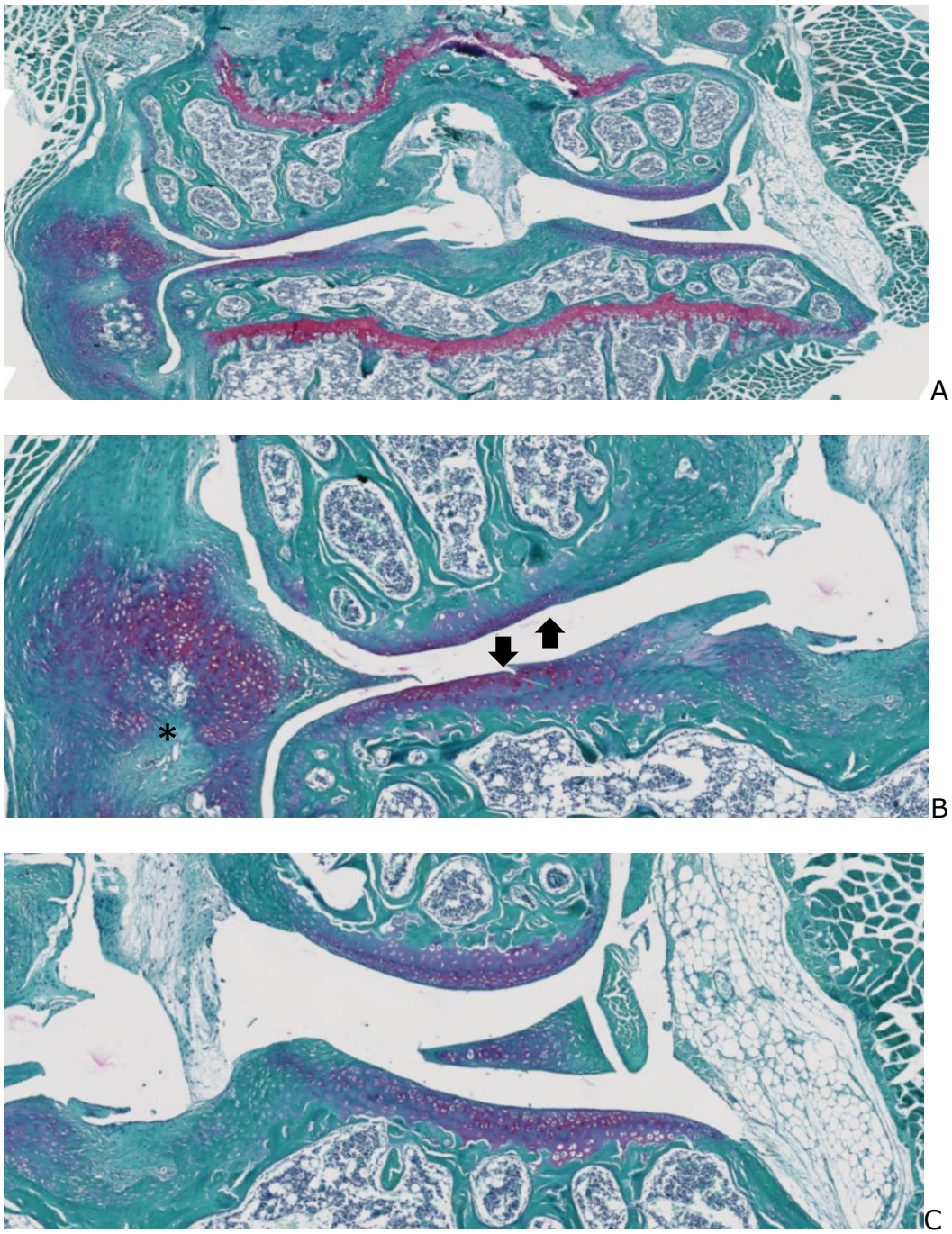


Figura 39: Corte histológico de la rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lateral (C) de ratón GzmB$^{-/-}$ hembra. En el lado medial (B) rugosidades en FM y fisura en TM (flechas) + condrogénesis (*). En lado lateral (C) cartílago indemne.

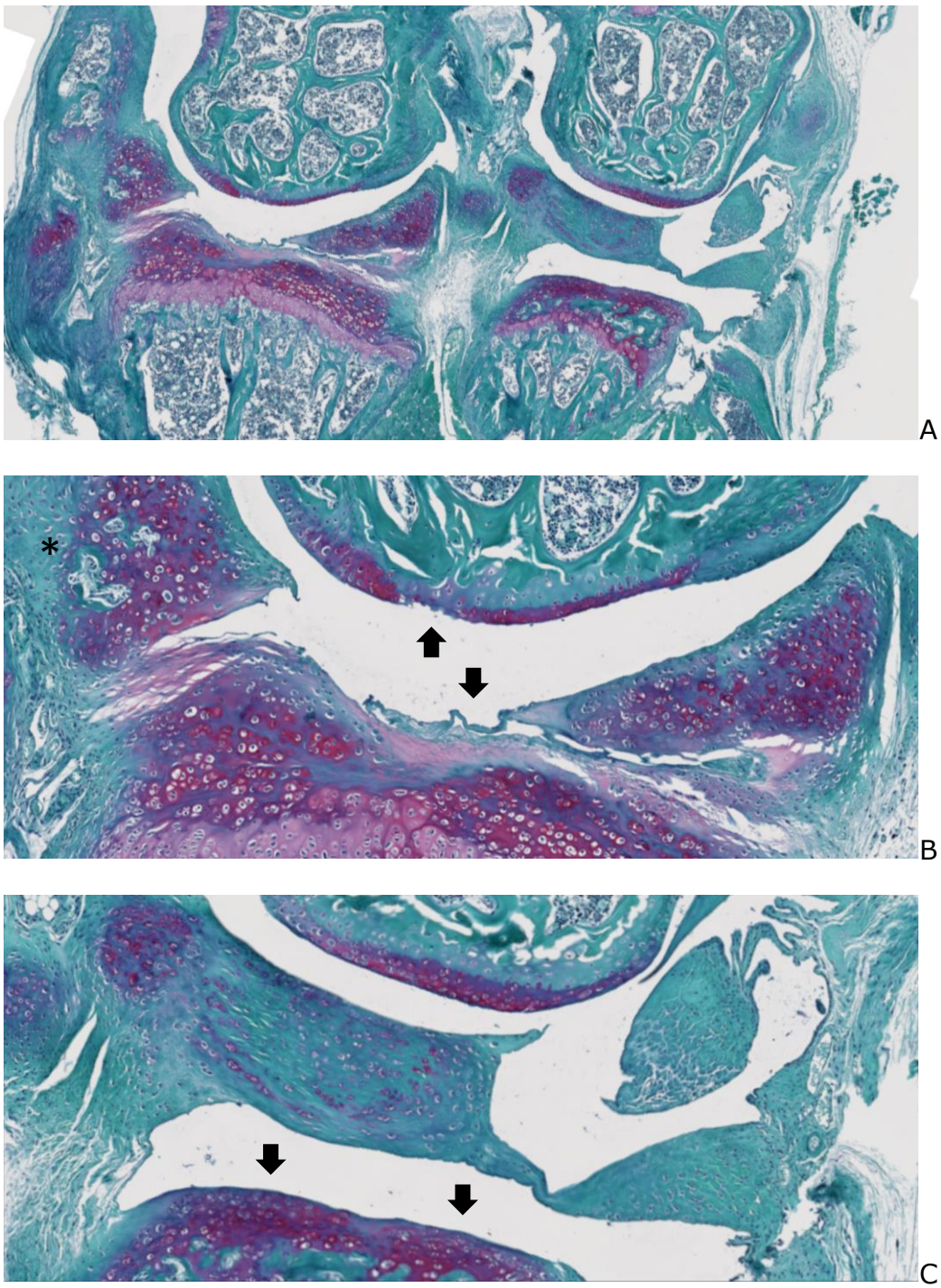


Figura 40: Corte histológico de la rodilla derecha completa (A), lado medial (B) y lateral (C) de ratón Perf$^{-/-}$ hembra. En el lado medial (B) erosiones en FM y en TM (flechas) + condrogénesis (*). En lado lateral (C) cartílago con leve rugosidad en lado tibial (flechas).

RESUMEN DE RESULTADOS

El método utilizado para inducción de artrosis en este estudio mediante desestabilización del ligamento menisco medial se mostró eficaz, lográndose la inducción de artrosis a las 8 semanas en las rodillas derechas de los ratones machos y hembras de las distintas cepas incluidas en el estudio. En las rodillas izquierdas en las que no se practicó la cirugía, no se encontraron diferencias entre los machos y las hembras en dicho lado (cirugía placebo) en los grupos gzmA-/-, gzmB-/-, perf-/-, aunque sí aparecieron pequeñas diferencias en el grupo control.

Al estudiar las diferencias entre cepas en función del sexo, se encontró que los ratones macho del grupo control –wt-, las rodillas derechas mostraron mayor severidad de artrosis en los cuadrantes laterales y mediales en las distintas escalas con respecto a los ratones hembra. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en el lado lateral pero no asi en el lado medial donde se practicó la cirugía (Figura 16). Todos los cuadrantes de las rodillas derechas presentaron peores puntuaciones en machos con respecto a las hembras en el grupo GzmA $^{-/-}$, siendo estadísticamente significativos en los cuadrantes tibiales medial y lateral (Figura 41A). En esta línea, también en el grupo GzmB $^{-/-}$ la severidad de la artrosis también fue significativamente más alta en los cuadrantes tibiales medial y lateral en los machos comparándolo con las hembras (Figura 41B). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras en los ratones perf$^{-/-}$ (Figura 41C) aunque los valores fueron más altos en los machos.

En las cortes histológicos, se observaron pronunciados cambios degenerativos en toda la articulación de la rodilla y especialmente en el lado medial de las rodillas derechas en ratones de los grupos control, fundamentalmente en ratones machos, con denudación y erosion en esta localización. Se observaron menos cambios degenerativos en el lado medial en ratones hembra GzmA$^{-/-}$ comparándolos con ratones macho GzmA$^{-/-}$. Había pequeñas fibrilaciones superficiales en el cóndilo femoral medial en los ratones hembra Gzm A$^{-/-}$. Por el contrario, se observó deformidad en el platillo tibial medial y denudación en el cóndilo lateral femoral en ratones macho GzmA$^{-/-}$. En cuanto al grupo de ratones GzmB $^{-/-}$, se observó denundación en el lado medial y erosiones en el cóndilo femoral lateral en

los ratones macho, mientras que los ratones hembra del mismo grupo mostraban pequeñas fibrilaciones superficiales en el platillo tibial medial (Figura 42).

Posteriomente se analizaron las diferencias en la severidad de artrosis en las rodillas derechas en las distintas cepas del mismo sexo para ver el efecto de la carencia de gzmA, gzmB y perf. Los machos, presentaron valores altos en el estadio OARSI en todas las cepas. Los ratones machos con ausencia de GzmA presentaron mejores puntuaciones con menor desarrollo de artrosis, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística (Figura 43). Por el contrario, los ratones hembra con déficit de GzmA, si que obtuvieron mejores resultados de forma estadísticamente significativa respecto al grupo control –wt- del mismo sexo en el estadio OARSI (Figura 43).

En cuanto al grupo GzmB $^{-/-}$, aunque se observaron menos cambios artrósicos comparando ambos sexos con el grupo control, estos no fueron estadísticamente significativos.

Finalmente, la deficiencia en perforina no modificó la severidad de la artrosis en ninguno de los sexos de forma estadísticamente significativa (Figura 43).

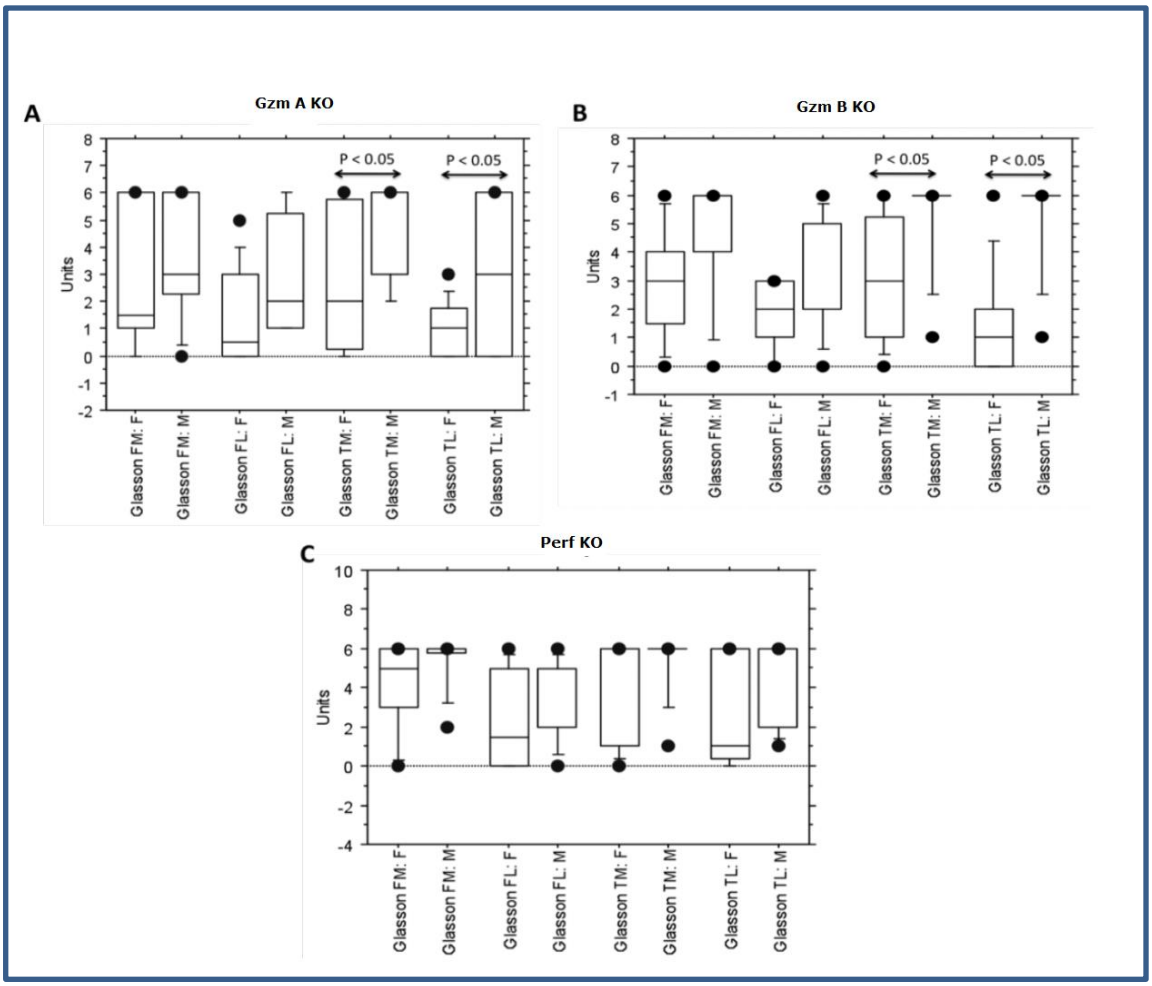


Figura 41: Puntuación en la escala de Glasson en ratones macho (M) y hembra (F) GzmA $^{-/-}$, Gzm B$^{-/-}$ y Perf$^{-/-}$ en los diferentes cuadrantes femorotibiales de las rodillas derechos (DMM).

FM: femur medial; FL: femur lateral; TM: tibia medial; TL: tibia lateral

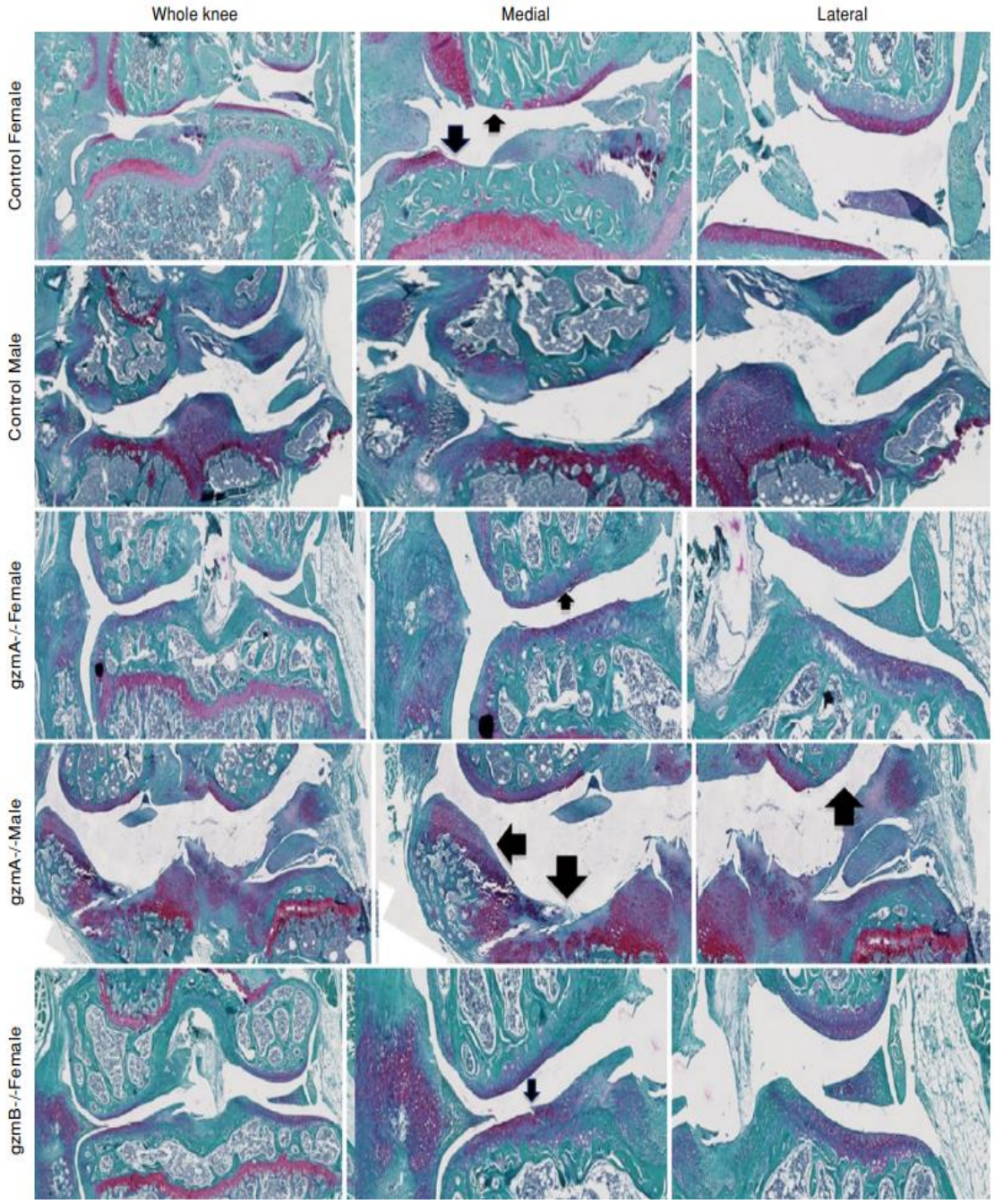


Figura 42: Tinción con O-safranina realizada en las rodillas derechas (DMM) de los ratones de los grupos control –wt- y GzmA $^{-/-}$ hembra y macho, y Gzm B $^{-/-}$ hembra. Rodillas completas en la imagen y lado medial y lateral en medio y a la derecha. Las flechas indican daño condral.

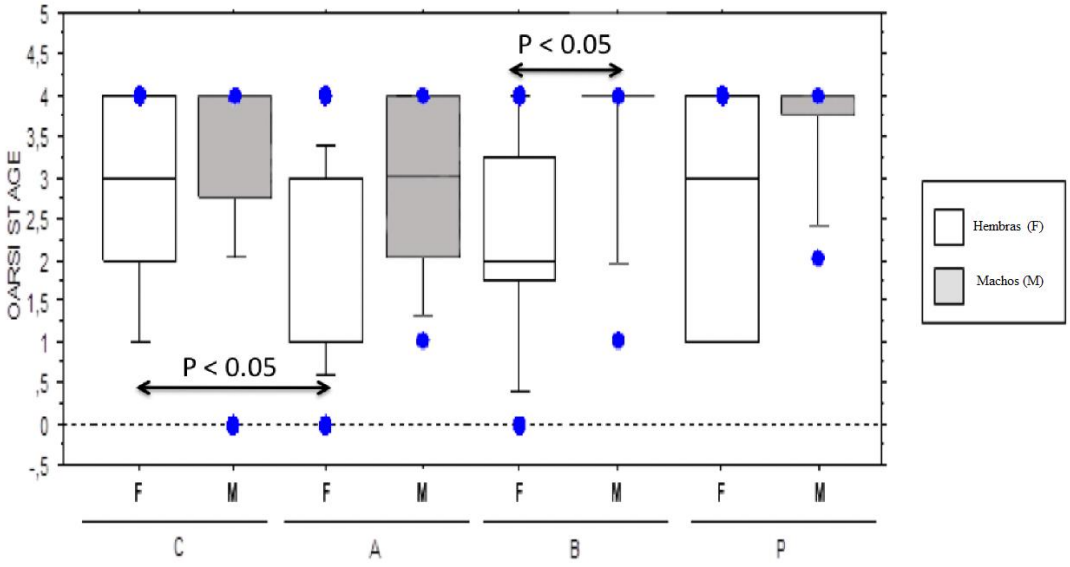


Figura 43: Grafico comparativo de las rodillas derechas (DMM) de ratones macho (M) y hembra (F) control (C), gzmA $^{-/-}$ (A), gzmB $^{-/-}$ (B), perf $^{-/-}$ (P) respecto al estadio OARSI. P<0,05

DISCUSIÓN

Muestra y tamaño muestral

El número de especímenes incluidos en este estudio ha sido finalmente de 75. Del total de 75 ratones, 40 de ellos eran ratones hembra (11 gzmA-/- 9 gzmB-/-, 10 perf-/- y 10 –wt-) y 35 eran ratones macho (8 gzmA-/-, 8 gzmB-/-, 9 perf-/- y 10 –wt-) tratándose de especímenes con un genotipo muy específico y de características muy homogéneas dentro de cada grupo.

Las series publicadas en la literatura en ratones KO en granzimas y perf donde se induce artrosis quirúrgicamente son inexistentes. Han sido publicadas series de inducción de artrosis de forma quirúrgica en ratones KO en genes o proteínas implicados en el desarrollo de artrosis. Por ejemplo, en un estudio con ratones de la proteína Wisp1/CCN4 (proteína 1 de la vía de señalización inducible de WNT1), ratones –wt- y Wisp1-/- se envejecieron o se indujo artrosis experimental con inyección de colagenasa intraarticular, desestabilización del menisco medial (DMM) o sección del ligamento cruzado anterior (ACLT). La patología articular se evaluó mediante histología y microCT (van den Bosch et al., 2017). Los resultados observados fueron que con el envejecimiento, la degeneración espontánea del cartílago en Wisp1-/- no disminuyó en comparación con sus controles –wt-. Sin embargo, se observó una disminución significativa de la degeneración del cartílago en ratones Wisp1-/- después de la inducción de artrosis de forma experimental con cualquiera de los tres modelos descritos anteriormente, si bien el grado de formación de osteofitos fue comparable entre los ratones –wt- y Wisp1-/-, se observó un aumento del grosor cortical y una reducción del espacio trabecular en los ratones Wisp1-/-. Se concluyó que Wisp1 juega un papel agravante en el desarrollo de la artrosis experimental postraumática en ratones (van den Bosch et al., 2017).

En otro estudio sobre el efecto de la eliminación de ADAMTS-4 y ADAMTS-5 en la progresión de la artrosis en ratones (Majumdar et al., 2007), se intervino a ratones ADAMTS-4/5 doble KO mediante inducción quirúrgica de inestabilidad articular para determinar la importancia de estos genes en la progresión de la artrosis. La deleción dual de ADAMTS-4 y ADAMTS-5 generó ratones que eran fenotípicamente indistinguibles de los ratones -wt-. La eliminación de ADAMTS-4/5 proporcionó una protección significativa contra la degradación de proteoglicanos ex vivo y disminuyó la

gravedad de la artrosis murina. Estos efectos en los ratones con doble inactivación de ADAMTS-4/5 fueron comparables con los observados con la eliminación de ADAMTS-5 solo.

Existen series de nuestro grupo (Santiago et al., 2017) donde se estudió el papel de GzmA en un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones pero no se trata exactamente de la misma patología puesto que el componente inflamatorio de la artritis es mayor al de la artrosis.

En el estudio de Glasson y cols. (Glasson et al., 2007) donde comparan modelos quirúrgicos de inducción de artrosis de rodilla en ratones, únicamente utilizan 10 ratones por cada uno de los grupos (ACTL vs DMM) y un mínimo de 6 animales por grupo en los grupos de cirugía placebo y no cirugía pero sin especificar el total de animales.

En un estudio de otro grupo (Ma et al., 2007), inducen artrosis desestabilizando el menisco medial en 139 ratones y posteriormente comparan los resultados entre los ratones machos y hembras observando que las hormonas juegan un papel fundamental en el desarrollo de artrosis en ese modelo, pero no estudian ratones con deleciones genéticas.

No se ha encontrado en la literatura ninguna serie de ratones KO en granzimas y perf donde se realice un experimento como el de nuestro grupo por lo que los resultados obtenidos son completamente novedosos en la literatura actual.

Procedimiento de inducción de la artrosis mediante el modelo DMM

En el presente estudio se ha analizado el papel de gzmA, gzm B y perf en el desarrollo de artrosis en un modelo experimental DMM. Para validar el procedimiento quirúrgico, se estableció una comparación entre las rodillas derechas (DMM) y las izquierdas (cirugía placebo). La desestabilización del menisco medial llevada a cabo mediante sección del LMM en las rodillas derechas indujo artrosis en los grupos control de ambos sexos tras 8 semanas, mientras la cirugía placebo en la rodilla izquierda no lo hizo por lo que esto nos sirve para validar el procedimiento quirúrgico como inductor

de artrosis. En esta misma línea, no se encontraron diferencias entre los machos y hembras en las rodillas izquierdas (cirugía placebo) en los grupos gzmA-/-, gzmB-/-, perf-/-, aunque sí aparecieron pequeñas diferencias en el grupo control. El modelo DMM en rodillas derechas tuvo suficiente sensibilidad para mostrar modificaciones patológicas en artrosis al igual que lo mostrado por otros autores (Glasson et al., 2007).

Un estudio reciente de inducción de artrosis en ratones mediante DMM (Fang et al., 2018) mostró lesiones leves en el cartílago de algunos ratones 2 semanas después de la cirugía, presentando pérdida regional de proteoglicanos, agrupación de condrocitos y formaciones de osteofitos cartilaginosos en el lado medial de la articulación quirúrgica, lo cual coincide con los hallazgos de los estudios de Loeser y Das Neves Borges (Das Neves Borges et al., 2017; Loeser et al., 2013). Las puntuaciones de OARSI fueron significativamente más altas en las articulaciones DMM en comparación con la cirugía placebo en todos los momentos del tiempo (Fang et al., 2018). Se observó daño leve a moderado del cartílago articular a las 5 y 10 semanas después de la cirugía. La formación de osteofitos progresó con el tiempo, y la osificación endocondral dentro del osteofito pudo observarse a las 10 semanas después de la cirugía. Las alteraciones en la marcha aparecieron únicamente 10 semanas después de la cirugía (Fang et al., 2018), pero no anteriormente, lo que podría deberse al desarrollo progresivo de dolor por la artrosis desarrollada y vista en otros estudios (Loeser et al., 2013). Estos cambios fueron relativamente leves y, sorprendentemente, afectaron a ambos miembros posteriores (no solo al operado). De acuerdo con estos hallazgos, se ha informado que los cambios de comportamiento en los roedores con artrosis generalmente se manifiestan como reducciones en los niveles totales de actividad locomotora (por ejemplo, tiempo activo y distancia recorrida) además de la alteración del patrón de marcha (Costello et al., 2010).

Los resultados de micro-CT mostraron que la densidad mineral ósea (DMO) del platillo tibial medial (PTM) en los animales operados con DMM fueron más variables que los controles con cirugía placebo a las 2 semanas posteriores a la cirugía (Fang et al., 2018) lo que sugiere que la desestabilización del menisco medial posiblemente conduce a la pérdida temprana de mineralización ósea subcondral en el PTM de algunos ratones

tan pronto como 2 semanas después de la cirugía DMM. Se detectaron diferencias más claras a las 5 y 10 semanas posteriores a la cirugía, con un aumento de la DMO en animales operados con DMM tanto en el PTM como en el cóndilo femoral medial (CFM). Además en dicho estudio se observó que una gran cantidad de genes se desregularon tan pronto como 6 horas después de la cirugía DMM mediante análisis de micromatrices de genes, incluidos los genes patógenos conocidos de artrosis Mmp3, Adamts5 y Ccl219. En otros estudios se ha visto como la regulación de genes seleccionados se anuló después de la inmovilización de la articulación intervenida, y la artrosis se evitó hasta 12 semanas después de la cirugía mediante inmovilización (Burleigh et al., 2012). En nuestro estudio no se realizó ningún tipo de inmovilización tras la cirugía, únicamente se administro analgesia a los especímenes. Esto indica que los cambios en la articulación del ratón después de DMM fueron rápidos y altamente mecanosensibles, a pesar de que la cirugía en sí se consideró leve. Parece probable que el hueso subcondral responda inmediatamente a la carga mecánica alterada dentro de la articulación, y que esta respuesta provoque o al menos contribuya en parte a los eventos fisiopatológicos posteriores de otras estructuras dentro de la articulación (Fang et al., 2018). Sin embargo, casi todos los estudios del genoma completo realizados en el modelo DMM utilizaron la articulación completa en lugar de tejidos articulares más específicos debido al pequeño tamaño de la articulación del ratón. La investigación adicional de diferentes tejidos articulares respectivamente (por ejemplo, hueso subcondral, menisco) proporcionaría información adicional sobre qué tejido responde primero.

Además, Fang y colaboradores (Fang et al., 2018) observaron subluxación/dislocación de la rótula que se produjo en algunos de los ratones después de la cirugía DMM tan pronto como 2 semanas después de la cirugía. Esto puede alterar la alineación de la rodilla, lo que complica la desestabilización articular introducida por DMM. La subluxación/dislocación de la rótula produce una carga mecánica anormal en el cóndilo femoral lateral y conduce a la formación de osteofitos. La degeneración del cartílago articular también apareció más rápido con esta anomalía, especialmente en los compartimentos laterales. El motivo de esta subluxación/dislocación de

la rótula no está claro. Posiblemente se deba a un deslizamiento de la sutura de la cápsula articular.

Con todos datos reportados en la literatura, se ha elegido este procedimiento de inducción de artrosis en rodillas de ratón frente a otros por ofrecer resultados consistentes y reproducibles en 8 semanas con desarrollo de artrosis moderada-severa (Glasson et al., 2007). Los modelos ACTL no se recomiendan en el ratón debido a que se necesita una mayor precisión quirúrgica y que la artrosis desarrollada por los animales puede ser muy severa produciendo una severa erosión del hueso subcondral y por lo tanto, se trata de un modelo mucho más agresivo y con más comorbilidades para los animales. En nuestro caso concreto se presentaron a la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal ambos modelos, siendo únicamente aceptado el modelo DMM por ser menos agresivo y con menor sufrimiento para los ratones de experimentación.

El modelo DMM se postula como la primera elección para el estudio de artrosis en ratones con deleciones genéticas al ser menos invasivo y no producir destrucción del hueso subcondral (Glasson et al., 2007).

Papel del sexo en un modelo DMM de inducción de artrosis en ratones

También se analizaron las diferencias en el desarrollo de artrosis en función del sexo. Comparando las rodillas derechas de los ratones macho y hembra, las hembras desarrollaron menor severidad de artrosis que los machos en todos los grupos de forma estadísticamente significativa. Tal como fue descrito previamente, mecanismos genéticos, hormonales, metabólicos, medioambientales y biomecánicos contribuyen todos ellos en la patogénesis de la artrosis (Ciobanu et al., 1994). Hay también una susceptibilidad individual (Stefik et al., 2021) que también influye en el desarrollo de artrosis y que explicaría por qué hay grupos con cambios histológicos presentes en las rodillas no operadas. El papel condroprotector de las hormonas sexuales femeninas ha sido previamente descrito (van Osch et al., 1993).

En un estudio similar de otro grupo (Ma et al., 2007), inducen artrosis desestabilizando el menisco medial en 139 ratones y posteriormente

comparan los resultados entre los ratones machos y hembras observando que las hormonas juegan un papel fundamental en el desarrollo de artrosis en ese modelo. Concluyen que los machos desarrollan artrosis de forma más severa, así como las hembras ovariectomizadas (OVX) tienen más artrosis que las no ovariectomizadas indicando que las hormonas femeninas ováricas disminuyen la severidad de la artrosis en ratones hembra. Las hormonas sexuales masculinas, como la testosterona, exacerban la artrosis en ratones macho, hecho demostrado por que los ratones orquiectomizados (ORX) desarrollan menos artrosis que los machos no intervenidos. Además el tratamiento con dihidrotestosterona (DHT) restauró por completo la gravedad de la artrosis de los ratones ORX a la de los machos control, y los ratones ORX tratado con DHT tenían significativamente más artrosis ($p< 0,001$) que los ratones ORX tratados con placebo (Ma et al., 2007). Además, el efecto de la DHT sobre la artrosis fue independiente del peso corporal, ya que el grupo tratado con testosterona tenía pesos corporales comparables al del grupo control (Ma et al., 2007).

En dicho estudio (Ma et al., 2007) observan diferencias en la gravedad de la artrosis entre ratones machos y hembras tras la desestabilización del menisco medial tan pronto como 2 semanas después de la cirugía con un daño de cartílago más extenso observado en ratones machos. Además la literatura muestra que los ratones hembra desarrollan menos artrosis con el modelo de inyección de colagenasa intraarticular así como mediante modelos de artrosis espontáneos. Estos resultados indican que la severidad de la artrosis en machos no es característica de una cepa en particular o de un sistema concreto de inducción de artrosis (van Osch et al., 1993; de Hooge et al., 1995; Mahr et al., 2003).

En nuestro estudio, en los ratones control intervenidos quirúrgicamente, se encontraron diferencias entre machos y hembras en el lado lateral de las rodillas derechas, lado que no había sufrido daño meniscal directo. Se puede hipotetizar que la afectación del lado lateral es debido a la progresión de la artrosis en los casos más severos y la subluxación rotuliana que puede producirse en estos casos ya que posiblemente sea una de las razones por las que los resultados quirúrgicos del DMM varían de un laboratorio a otro y de un individuo a otro (Fang et

al., 2018) y que la diferencia entre machos y hembras probablemente estaría asociada con las hormonas sexuales.

Papel de Gzm A en la inducción de artrosis en ratón mediante DMM.

En hembras, el grupo control mostró la mayor severidad de artrosis, mientras que los ratones hembra deficientes en GzmA y GzmB mostraron menos artrosis que los ratones –wt- y también los deficientes en perf. Se observaron menos cambios degenerativos en el estadio OARSI en ratones hembra GzmA$^{-/-}$ y GzmB$^{-/-}$, especialmente en el grupo GzmA$^{-/-}$ donde las diferencias con el grupo control fueron estadísticamente significativas. Estos resultados apoyan el importante papel de la GzmA extracelular en el desarrollo de cambios degenerativos artrósicos inducidos con el modelo DMM.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica caracterizado por inflamación de las articulaciones (sinovitis), autoanticuerpos, inflamación sistémica y destrucción osea y cartilaginosa (Scott et al., 2010; Sardar et al., 2016). La membrana sinovial está infiltrada por múltiples células inmunes, incluyendo células T, células B, macrófagos, y células NK. La inflamación, predominantemente mediada por IL-1 y TNF-α, provoca inflamación y dolor en las articulaciones (Scott et al., 2010; Tak et al., 1999). El final el resultado de la enfermedad es la destrucción de la articulación (Scott et al., 2010; Sardar et al., 2016). Aunque los factores externos que regulan el TNF son bien conocidos, los factores endógenos pueden amplificar la expresión de TNF. Niveles elevados de gzmA en plasma, líquido sinovial y tejido sinovial se han descrito en pacientes con AR (Spaeni et al., 1998; Tak et al., 1999; Kummer et al., 1994). Se han registrado niveles marcadamente más altos de gzmA en líquido sinovial (hasta 10 veces mayor que los pacientes con osteoartritis o artritis reactiva), mientras que los niveles plasmáticos de gzmA son más similares a los de los controles sanos. Esto sugiere una liberación local de GzmA (Spaeny et al., 1998; Tak et al., 1999).

En esta línea, nuestro grupo (Santiago et al., 2017) describió recientemente que la deleción genética de GzmA atenúa la artritis en un modelo de artritis

inducida por colágeno en ratón (CIA del inglés, *Collagen Induced Arthritis*), incluyendo los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias, el daño articular y la erosión ósea en los ratones afectados, sugiriendo que la actividad osteoclástica está reducida en ausencia de GzmA. En nuestro estudio, se observó menor desarrollo de artrosis en el grupo gzmA$^{-/-}$ por lo que nuestros resultados son comparables a los de dicho estudio (Santiago et al., 2017) con el modelo CIA. Además, en dicho trabajo (Santiago et al., 2017) tanto las puntuaciones clínicas como histológicas fueron significativamente mejores en ratones deficientes en gzmA en el modelo CIA mostrando que solo el 40% de los ratones gzmA $^{-/-}$ desarrollaban poliartrosis comparando con el 80% y el 60% de los ratones sin mutaciones y los perf$^{-/-}$ respectivamente. Por otra parte, la severidad de la poliartrosis en animales CIA se redujo también en más del 50% en ratones deficientes en gzmA. Los ratones con CIA presentaron niveles extracelulares significativamente elevados de gzmA en sus articulaciones y en el plasma y células activadas en etapas tempranas y tardías de la enfermedad. La CIA solo fue únicamente ligeramente reducida en ratones perf$^{-/-}$ por lo tanto, la función de gzmA parece independiente de la perforina (Santiago et al., 2017).

La función de GzmA extracelular en la sinovitis y la destrucción articular sigue sin estar clara. En cuanto a la sepsis bacteriana, GzmA promueve la inflamación de la articulación al estimular la liberación de citoquinas proinflamatorias (Bots et al., 2006; Arias et al., 2014; Tak et., 1999). IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-8, producidas principalmente por macrófagos y fibroblastos, están abundantemente presentes en la membrana sinovial de los pacientes con AR (Tak et al., 1999).

Los ratones CIA tienen niveles aumentados de IL-6 y TNF-α durante tanto las etapas tempranas como las tardías de la enfermedad en comparación con los ratones –wt-, mientras que estas citoquinas se reducen en ratones gzmA $^{-/-}$ CIA (Santiago et al., 2017). Además, gzmA puede contribuir a la artritis reumatoide en parte mediante la estimulación de la diferenciación de precursores de osteoclastos de ratones a través de la estimulación de la secreción de TNF-α de monocitos y osteoclastos precursores presentes en la articulación inflamatoria (Santiago et al., 2017). Los osteoclastos son células que llevan a cabo la resorción ósea y se

ha demostrado que contribuyen a la destrucción en la AR (Hirayama et al., 2002). Finalmente, la degradación de la matriz extracelular inducida por gzmA extracelular podría contribuir a la patogénesis. Fragmentos de fibronectina biológicamente activos encontrados en la membrana sinovial pueden inducir la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos, inducir la metaloproteinasa de matriz (MMP), inducir la expresión de agrecanasa condrocitaria e interrumpir la adhesión celular de condrocito (Buzza et al., 2006). La degradación de la matriz extracelular puede ayudar a la migración de linfocitos T citotóxicos activados a través de la membrana basal endotelial y facilitar la entrada de células mononucleares que contribuyen a hiperplasia y destrucción articular (Müller-Ladner et al., 1995).

Todos estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro trabajo.

Otras enfermedades inflamatorias, como la enfermedad de Behçet (EB), la enfermedad celíaca (EC) y la enteropatía sensible a la proteína de la leche de vaca (CMSE), también muestran niveles de GzmA elevados en suero y/o plasma (Accardo-Palumbo et al., 2004; Augustin et al., 2005). Varios microorganismos, la hiperfunción de los neutrófilos y la autoinmunidad han sido implicados como agentes causales en la EB.

Usando un ensayo de esterasa medida mediante benzyloxycarbonyl-L-lysine thiobenzyl ester (BLT), los pacientes con EB activa muestran un aumento de los niveles de gzmA en sobrenadantes de linfocitos correlacionados con el factor de expansión Vγ9Vδ2, lo que sugiere una participación activa de los linfocitos T citotóxicos y gzmA en la patogénesis de EB. El papel biológico de extracelular gzmA en la EB no ha sido estudiado. A medida que los niveles de gzmA están elevados tanto en el sobrenadante como en el suero, se especula con un papel extracelular para gzmA (Accardo-Palumbo et al., 2004). Además, la respuesta inmune intestinal tanto en CMSE como en la enfermedad celiaca (EC) se manifiesta por un aumento sérico de GzmA, GzmB y CD30. La gzmA elevada se correlaciona con la extensión de la atrofia de las vellosidades en la EC. Esto ofrece nuevas perspectivas para el diagnóstico y evaluación de estas enfermedades aunque se necesitan estudios más completos (Augustin et al., 2005).

Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado previamente que las células NK de la sinovial de pacientes con artrosis, las cuales presenta una función inmunoreguladora y no citotóxica, mostraron diferentes fenotipos comparándolas con las células NK de la sangre periférica (Jaime et al., 2017). Las células NK CD 56+^{bright} CD 16 del líquido sinovial con menos capacidad citotóxica expresaban proporcionalmente niveles más altos de gzmA que las células NK CD 56+^{bright}CD 16 de la sangre periférica (Jaime et al., 2017) Además la presencia de las células NK CD 56+^{bright}CD 16 que expresaban gzmA estaba correlacionada con el incremento en el líquido sinovial de los niveles de citoquinas proinflamatorias como el TNF-α e IL-6 (Jaime et al., 2017). Estos datos apuntan a que la gzmA expresada por las células NK en pacientes con artrosis puede jugar un papel promoviendo inflamación en las articulaciones afectadas de pacientes con artrosis. En esta línea la gzmA ha sido descrita como un mediador proinflamatorio clave en la artritis por virus Chikungunya (Wilson et al., 2017).

La literatura actual acumula evidencias del papel de gzmA como proteasa proinflamatoria y como moduladora de la respuesta inflamatoria en diversas enfermedades mientras que el potencial papel citotóxico conocido clásicamente cada vez está más en entredicho (van Daalen et al., 2020)

Como se ha indicado en la introducción de este trabajo, las granzimas son fundamentalmente expresadas en las células NK y en los linfocitos T CD8+ (Kouizumi et al., 1991; Pardo et al., 2007), y la principal función descrita inicialmente era la de inducir la muerte celular de las células objetivo infectadas o transformadas, por lo que la completa inhibición de las granzimas puede deteriorar las respuestas defensivas contra las infecciones y los tumores. Una regulación a la baja en situaciones proinflamatorias podría ser en este caso más beneficiosa.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren por lo tanto que la gzmA podría jugar un papel muy importante en el desarrollo temprano de la artrosis actuando como una proteasa proinflamatoria promoviendo el desarrollo de la enfermedad.

Papel de la GzmB en la inducción de artrosis en ratón mediante DMM.

Niveles elevados de gzmB encontrados en diversos fluidos biológicos han sido relacionados con la progresión de diferentes enfermedades inflamatorias (Granville, 2010; Hiebert y Granville, 2012).

Concretamente, varios estudios han indicado la presencia de células granzima positivas en tejido sinovial de pacientes con AR, siendo la expresión de gzmB más alta en tejido sinovial reumatoide que en el tejido sinovial artrósico, aunque estaba elevado en ambos (Darrah et al., 2017; Kummer et al., 1994). En un estudio realizado por Colombo y cols. (Colombo et al., 2016), estos autores descubrieron que los niveles séricos de gzmB de 18 pacientes con AR estaban correlacionados con la actividad de la enfermedad medida según la puntuación DAS28-CRP y que se redujeron significativamente los niveles de gzmB tras el tratamiento. Sin embargo, la importancia de la gzmB, y especialmente su papel en el daño articular en la AR, sigue siendo poco claro.

En un estudio reciente (Qiao et al., 2020) se comparan los niveles de gzmB en pacientes con AR frente a controles y pacientes con artrosis, estando significativamente más elevados en la AR en comparación con las artrosis y los pacientes control coincidiendo con los hallazgos de los estudios de Kummer y colaboradores y Darrah y colaboradores (Kummer et al., 1994; Darrah et al,. 2017). En este mismo estudio (Qiao et al., 2020) los niveles de gzmB se correlacionaron fuerte y positivamente con las valoraciones de destrucción articular en pacientes con AR, concluyendo que el nivel de GzmB podría ser un buen marcador para predecir el daño potencial articular.

Además, trabajos recientes han revelado un papel potencial de las granzimas en el aumento de la degradación de matriz extracelular, que podría acelerar la destrucción de cartílago y hueso en la AR. La degradación de matriz extracelular mediada por granzimas puede facilitar la movilización de linfocitos citotóxicos y otros leucocitos in vivo o productos de degragación que pueden atraer varias células inmunitarias, contribuyendo a la inflamación local (Xu et al., 2017).

Por último, la gzmB extracelular puede dividirse y activar diversas citoquinas proinflamatorias importantes, incluidas la IL-6, la IL-8 y el TNF-α (Wensink et al., 2015).

En nuestro estudio, se han observado menores cambios degenerativos en las rodillas derechas intervenidas de los ratones hembra deficientes en gzmB en comparación con el grupo control. Sin embargo, al contrario que con los ratones hembra deficientes en GzmA, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. A pesar de esto, la implicación de gzmB en el desarrollo de la artrosis no puede ser descartada. Los resultados obtenidos en el grupo perf$^{-/-}$ sugieren un papel de las granzimas independiente de la perforina en el modelo DMM de artrosis, por lo que la gzmB podría contribuir al desarrollo de la patología debido a la capacidad de degradar proteínas de la matriz extracelular como ya ha sido descrito previamente (Hiebert y Granville, 2012; Shen et al., 2016).

En la literatura reciente, está emergiendo el papel de la gzmB como un importante mediador del daño en la piel, su inflamación y reparación (Turner et al., 2019). La gzmB se encuentra en niveles bajos en la piel sana mientras que está elevada enormemente en enfermedades crónicas y procesos inflamatorios de la piel entre los que se incluyen úlceras diabéticas (Hsu et al., 2014) cicatrices hipertróficas (Bakry et al., 2015), desordenes autoinmunes cutáneos (Hussein et al., 2008), leishmaniosis cutánea (Novais et al., 2013) y envejecimiento de la piel. Como ejemplo de esto último, se ha observado que la decorina, un proteoglicano abundante en la piel, es degradado por la gzmB y su clivaje contribuye a la desorganización del colágeno y al envejecimiento de la piel en el ratón (Hiebert et al., 2011).

Tradicionalmente conocida por sus funciones proapoptóticas, el papel de la gzmB en enfermedades se ha redefinido debido al descubrimiento de actividades adicionales que incluyen la escisión de las proteínas de la matrix extracelular, las disrupciones de la barrera epitelial, la fibrosis, la permeabilidad vascular, anoikis, inflamación y autoinmunidad pudiendo afectar a procesos como la remodelación tisular, la función de barrera de la piel, la generación de autoantígenos y la angiogénesis (Buzza et al., 2005; Parkinson et al., 2015).

Papel de la perforina en la inducción de artrosis en ratón mediante DMM.

Tal y como se ha mencionado en la introducción de este trabajo, históricamente se han hipotetizado diversos modelos para intentar explicar el mecanismo de acción de la perf, sin embargo, en los últimos años, los trabajos sugieren que la perf forma directamente poros en la membrana plasmática y de este modo permite el paso de las granzimas al interior de las células diana (Law et al., 2010; Metkar et al., 2011; Metkar et al., 2015; Voskoboinik et al., 2015).

La perforina, también ha sido implicada en el desarrollo de CIA pero no de la misma forma que la gzmA (Bauer et al., 2005). Hay que tener en cuenta que el componente inflamatorio de la artritis es mayor que el de la artrosis. En este modelo CIA, a los ratones se les inyectaba en la cola colágeno bovino. Los ratones perf$^{-/-}$ mostraban retraso en el inicio de la enfermedad y una disminución de la incidencia de la artritis pero algunos especímenes, de forma individual, desarrollaban artritis de forma severa. Aunque otras vías patológicas de citotoxicidad independientes de perforina como la vía Fas/FasL, podrían estar envueltas en el desarrollo de CIA, los resultados de este estudio sugerían que la citotoxicidad perforina dependiente estaba implicada en el inicio del daño tisular en la artritis.

Cabe recordar, que la perforina es una proteína formadora de poros que facilita la acción intracelular citotóxica de las granzimas. En nuestro estudio, los ratones hembra perf$^{-/-}$ desarrollan una artrosis más severa en las rodillas intervenidas (derechas) que los ratones gzmA$^{-/-}$ y gzmB$^{-/-}$ indicando que la perforina no protegería del desarrollo de la artrosis. Estos hallazgos sugieren que la contribución de la gzmA y la gzmB en el desarrollo de la patología articular parece ser independiente de la perforina y sería debida a su actividad extracelular. Estos resultados concuerdan con otros estudios (Santiago et al., 2017), y confirman la relevancia fisiológica de estudios previos en los cuales la gzmA extracelular fue detectada tanto en el suero como en el líquido sinovial de humanos con otras enfermedades articulares como la artritis reumatoide (Tak et al., 1999).

Además, las células NK 56+^{bright}CD 16 del líquido sinovial expresan niveles altos de gzmA en pacientes con artrosis como se ha dicho

previamente (Jaime et al., 2017) y muestran proporcionalmente bajos niveles de perforina y consecuentemente menor actividad citotóxica, sugiriendo también que la gzmA juega un rol a nivel extracelular incluso mayor que el papel perforina dependiente intracelular.

Limitaciones del estudio

A pesar de los hallazgos de nuestro estudio, el presente trabajo presenta ciertas limitaciones.

Se trata de un estudio experimental en ratones, por lo que los resultados pueden ser diferentes en los humanos y por lo tanto la extrapolación de los mismos debe llevarse a cabo con mucha cautela, aunque los datos observados están en consonancia con los observados previamente en humanos.

Se trata de una muestra relativamente pequeña de ratones por lo que puede ser difícil observar diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, las series en la literatura son similares o incluso con menos especímenes.

El modelo DMM de inducción de artrosis en ratones es un modelo exigente quirúrgicamente al tratarse de animales muy pequeños. La cirugía ha sido realizada por un mismo especialista en Cirugía Ortopédica y Traumatología con años de experiencia y entrenado en técnicas microquirúrgicas en ratones, no obstante, este tipo de procedimiento no forma parte de su práctica clínica habitual por lo que los resultados podrían no ser los óptimos a pesar de que se ha observado inducción clara de artrosis en las rodillas intervenidas.

Los ratones hembra desarrollaron una artrosis menos severa en el grupo control respecto a los machos por lo que nuestros resultados concuerdan con los reportados previamente indicando por tanto un posible efecto condroprotector de las hormonas sexuales femeninas, sin embargo, en nuestro estudio no ha sido posible analizar las hormonas sexuales en los especímenes intervenidos.

Aunque las cepas de ratones deficientes en gzmA, gzmB y perforina fueron estudiadas y comprobadas, los niveles de granzimas en sangre periférica y a nivel intraarticular no fueron evaluados. Los posibles efectos negativos a largo plazo de la eliminación completa en la producción de la gzmA, gzmB y perforina no han sido analizados en este estudio.

Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. La desestabilización quirúrgica del menisco medial de la rodilla en un modelo experimental en ratones, provocó a las ocho semanas de la cirugía el desarrollo de artrosis en la rodilla intervenida en comparación con la rodilla contralateral en ratones macho y hembra.

2. En el grupo control, sin déficits de granzimas ni perforina, los ratones macho presentaron un mayor desarrollo de la artrosis que los ratones hembra en el compartimento lateral de la rodilla a las ocho semanas de la desestabilización quirúrgica del menisco medial de la rodilla.

3. En el grupo que no expresaba granzima A los ratones macho presentaron un mayor desarrollo de la artrosis que los ratones hembra, a las ocho semanas de la desestabilización quirúrgica del menisco medial de la rodilla

4. En el grupo que no expresaba granzima B los ratones macho presentaron un mayor desarrollo de la artrosis que los ratones hembra, a las ocho semanas de la desestabilización quirúrgica del menisco medial de la rodilla.

5. En el grupo que no expresaba perforina, no se apreciaron diferencias entre los ratones hembra y los ratones macho en cuanto a la severidad en la artrosis de rodilla, a las ocho semanas de la desestabilización quirúrgica del menisco medial de la rodilla.

6. Los ratones hembra del grupo que no expresaba granzima A presentaron menor severidad en la artrosis de rodilla que el grupo control, a las ocho semanas de la desestabilización quirúrgica del menisco medial de la rodilla.

Apéndice

CONFLICTO DE INTERESES

El autor y directores de este trabajo no recibieron ninguna financiación externa o donaciones como apoyo a su investigación, o para la preparación de este trabajo. Tampoco recibieron pagos u otros beneficios de una entidad comercial.

PUBLICACIONES

Este trabajo ha sido publicado en la revista Joint Deseases and Related Surgery (Calvo J, Santiago L, Arias M, Pardo J, Albareda J, Martínez-Lostao L, García-Alvarez F. Granzyme-A deficiency attenuates experimental osteoarthritis in mice, but perforin deficiency does not. Jt Dis Relat Surg. 2023 Apr 27;34(2):271-278. doi: 10.52312/jdrs.2023.892. PMID: 37462629; PMCID: PMC10367147).

ATRIBUCION IMÁGENES LICENCIA LIBRE WIKIMEDIA COMMONS

Figura 2: no modificada. Usuario כסלו סתו

Figura 3: no modificada. Usuarios Wurzer H., Filali L., Thomas C. from How natural killer cells avoid self-destruction when killing their targets. PLoS Biol 19(8): e3001339. (2021} doi:10.1371/journal.pbio.3001339.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta han hecho posible que este trabajo se haya llevado a cabo.

De forma especial quiero dar las gracias:

A María, mi esposa y fiel compañera de viaje por tu apoyo y tu confianza en mi trabajo y por estar siempre presente. Gracias por tu enorme paciencia en este largo camino.

A mis padres, por todos los esfuerzos realizados para que yo llegara a cumplir mis metas y por su cuidado. Ejemplos de trabajo, constancia y superación.

A mis amigos de siempre, fieles compañeros de batallas, siempre presentes cuando los he necesitado.

A mis directores de tesis, Felícito y Luis, por ser el estímulo permanente para continuar, mejorar y concluir este arduo trabajo. Ejemplos de compromiso y responsabilidad.

A mis compañeros del Servicio de Traumatología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, por su contribución a mi formación tanto traumatológica, como personal, en especial a mi Jefe de Servicio el Dr. Albareda y mi compañera de residencia y amiga la Dra. Redondo.

BIBLIOGRAFÍA

--- Accardo-Palumbo A, Ferrante A, Cadelo M, Ciccia F, Parrinello G, Lipari L, Giardina AR, Riili M, Giardina E, Dieli F, Triolo G. The level of soluble Granzyme A is elevated in the plasma and in the Vgamma9/Vdelta2 T cell culture supernatants of patients with active Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol. 2004 Jul-Aug;22(4 Suppl 34):S45-9.

--- Ackerman IN, Bohensky MA, Zomer E, Tacey M, Gorelik A, Brand CA, de Steiger R. The projected burden of primary total knee and hip replacement for osteoarthritis in Australia to the year 2030. BMC Musculoskelet Disord. 2019 Feb 23;20(1):90.

--- Afonina IS, Cullen SP, Martin SJ. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. Immunol Rev. 2010; 235(1): 105-16.

--- Andrade F, Fellows E, Jenne DE, Rosen A, Young CS. Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition. EMBO J. 2007 Apr 18;26(8):2148-57.

--- Andrade, F. Non-cytotoxic antiviral activities of granzymes in the context of the immune antiviral state. Immunol Rev. 2010; 235(1), 128-146.

--- Andrin C, Pinkoski MJ, Burns K, Atkinson EA, Krahenbuhl O, Hudig D, Fraser SA, Winkler U, Tschopp J, Opas M, Bleackley RC, Michalak M. Interaction between a Ca2+-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. Biochemistry. 1998 Jul 21;37(29):10386-94.

--- Anthony DA, Andrews DM, Chow M, Watt SV, House C, Akira S, Bird PI, Trapani JA, Smyth MJ. A role for granzyme M in TLR4-driven inflammation and endotoxicosis. J Immunol. 2010 Aug 1;185(3):1794-803

--- Arias MA, Jiménez de Bagües MP, Aguiló N, Menao S, Hervás-Stubbs S, de Martino A, Alcaraz A, Simon MM, Froelich CJ, Pardo J. Elucidating sources and roles of granzymes A and B during bacterial infection and sepsis. Cell Rep. 2014; 8(2): 420-9.

--- Arias M, Martínez-Lostao L, Santiago L, Ferrandez A, Granville DJ, Pardo J. The Untold Story of Granzymes in Oncoimmunology: Novel Opportunities with Old Acquaintances. Trends Cancer. 2017; 3(6): 407-422.

--- Arias MA, Santiago L, Costas-Ramon S, Jaime-Sánchez P, Freudenberg M, Jiménez De Bagüés MP, Pardo J. Toll-Like Receptors 2 and 4 Cooperate in the Control of the Emerging Pathogen Brucella microti. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Jan 9;6:205.

--- Augustin MT, Kokkonen J, Karttunen R, Karttunen TJ. Serum granzymes and CD30 are increased in children's milk protein sensitive enteropathy and celiac disease. J Allergy Clin Immunol. (2005) 115:157–62.

--- Bade B, Boettcher HE, Lohrmann J, Hink-Schauer C, Bratke K, Jenne DE, Virchow JC Jr, Luttmann W. Differential expression of the granzymes A, K and M and perforin in human peripheral blood lymphocytes. Int Immunol. 2005; 17(11): 1419-28.

--- Bakry OA, Younes SF, Abdel Wahed M, El Farargy SM, Sharawy S. Evaluation of the Role of Granzyme B in Exuberant Scar Pathogenesis: An Immunohistochemical Study. Anal Quant Cytopathol Histpathol. 2015 Aug;37(4):221-6.

--- Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. J Exp Med. 2002 Aug 19;196(4):493-503.

--- Baran K, Ciccone A, Peters C, Yagita H, Bird PI, Villadangos JA, Trapani JA. Cytotoxic T lymphocytes from cathepsin B-deficient mice survive normally in vitro and in vivo after encountering and killing target cells. J Biol Chem. 2006 Oct 13;281(41):30485-91.

--- Baschuk, N., Wang, N., Watt, S.V., Halse, H., House, C., Bird, P.I., et al. (2014). NK cell intrinsic regulation of MIP-1alpha by granzyme M. Cell Death Dis 5, e1115.

--- Bauer K, Knipper A, Tu-Rapp H, Koczan D, Kreutzer HJ, Nizze H, Mix E, Thiesen HJ, Holmdahl R, Ibrahim SM. Perforin deficiency attenuates collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther. 2005; 7(4):R877-84.

--- Bird CH, Sutton VR, Sun J, Hirst CE, Novak A, Kumar S, Trapani JA, Bird PI. 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 Nov;18(11):6387-98.

---Blanco FJ, Silva-Díaz M, Quevedo Vila V, Seoane-Mato D, Pérez Ruiz F, Juan-Mas A, Pego-Reigosa JM, Narváez J, Quilis N, Cortés R, Romero Pérez A, Fábregas Canales D, Font Gayá T, Bordoy Ferrer C, Sánchez-Piedra C, Díaz-González F, Bustabad-Reyes S; en representación del Grupo de Trabajo del Proyecto EPISER2016. Prevalence of symptomatic osteoarthritis in Spain: EPISER2016 study. Reumatol Clin (Engl Ed). 2020 Apr 28: S1699-258X(20)30023-1.

--- Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. Curr Opin Immunol. 2007 Jun;19(3):339-47.

--- Bots M, Medema JP. Granzymes at a glance. J Cell Sci. 2006 Dec 15;119(Pt 24):5011-4.

--- Brandt KD, Braunstein EM, Visco DM, O'Connor B, Heck D, Albrecht M. Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: a bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. J Rheumatol 1991;18:436e46.

--- Bratke K, Böttcher B, Leeder K, Schmidt S, Küpper M, Virchow JC Jr, Luttmann W. Increase in granzyme B+ lymphocytes and soluble granzyme B in bronchoalveolar lavage of allergen challenged patients with atopic asthma. Clin Exp Immunol. 2004; 136(3): 542-8.

--- Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. Annual review of immunology. 2015;33:257-90.

--- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instr Course Lect 1998;47:487–504

--- Burleigh A, Chanalaris A, Gardiner MD, Driscoll C, Boruc O, Saklatvala J, Vincent TL. Joint immobilization prevents murine osteoarthritis and reveals the highly mechanosensitive nature of protease expression in vivo. Arthritis Rheum. 2012 Jul;64(7):2278-88.

--- Buzza MS, Zamurs L, Sun J, Bird CH, Smith AI, Trapani JA, Froelich CJ, Nice EC, Bird PI. Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. J Biol Chem. 2005 Jun 24;280(25):23549-58.

--- Buzza MS, Bird PI. Extracellular granzymes: current perspectives. Biol Chem. 2006 Jul;387(7):827-37.

--- Buzza MS, Dyson JM, Choi H, Gardiner EE, Andrews RK, Kaiserman D, Mitchell CA, Berndt MC, Dong JF, Bird PI. Antihemostatic activity of human granzyme B mediated by cleavage of von Willebrand factor. J Biol Chem. 2008 Aug 15;283(33):22498-504.

--- Chambers MG, Bayliss MT, Mason RM. Chondrocyte cytokine and growth factor expression in murine osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 1997; 5(5):301-8.

--- Ciobanu A, Ciobanu IR, Hălălău F, Laky D, Ionescu T, Popescu M, Dinulescu I, Stănculescu D. Pathogenesis aspects of arthrosis in histopathological and electronmicroscopical studies of articular cartilage, correlated to some immunological parameters. Rom J Morphol Embryol. 1994 Jul-Dec;40(3-4):109-17.

--- Clements KM, Price JS, Chambers MG, Visco DM, Poole AR, Mason RM. Gene deletion of either interleukin1beta, interleukin-1beta-converting enzyme, inducible nitric oxide synthase, or stromelysin 1 accelerates the development of knee osteoarthritis in mice after surgical transection of the medial collateral ligament and partial medial meniscectomy (see comment). Arthritis Rheum 2003;48:3452e634(97)80034-9.

--- Colombo E, Scarsi M, Piantoni S, et al. Serum levels of granzyme B decrease in patients with rheumatoid arthritis responding to abatacept. Clin Exp Rheumatol 2016; 34: 37–41.

--- Conaghan PG. Osteoarthritis in 2012: parallel evolution of OA phenotypes and therapies. Nat Rev Rheumatol 2013;9:68–70

--- Cooper DM, Pechkovsky DV, Hackett TL, Knight DA, Granville DJ. Granzyme K activates protease-activated receptor-1. PLoS One. 2011;6(6):e21484.

--- Costello KE, Guilak F, Setton LA, Griffin TM. Locomotor activity and gait in aged mice deficient for type IX collagen. *J Appl Physiol.* 2010;109:211–218.

--- Cross M, Smith E, Hoy D, Nolte S, Ackerman I, Fransen M, Bridgett L, Williams S, Guillemin F, Hill CL, Laslett LL, Jones G, Cicuttini F, Osborne R, Vos T, Buchbinder R, Woolf A, March L. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. Ann Rheum Dis. 2014 Jul;73(7):1323-30.

--- Culemann S, Gruneboom A, Nicolas-Avila JA, Weidner D, Lammle KF, Rothe T, Quintana JA, Kirchner P, Krljanac B, Eberhardt M, Ferrazzi F, Kretzschmar E, Schicht M, Fischer K, Gelse K, Faas M, Pfeifle R, Ackermann JA, Pachowsky M, Renner N, Simon D, Haseloff RF, Ekici AB, Bauerle T, Blasig IE, Vera J, Voehringer D, Kleyer A, Paulsen F, Schett G, Hidalgo A, Kronke G. 2019. Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. Nature 572: 670-5

--- Darrah E, Kim A, Zhang X, Boronina T, Cole RN, Fava A, Giles JT, Bingham III CO, Chalmers MJ, Griffin PR, Sadegh-Nasseri S, Rosen A. Proteolysis by Granzyme B Enhances Presentation of Autoantigenic Peptidylarginine Deiminase 4 Epitopes in Rheumatoid Arthritis. J Proteome Res. 2017 Jan 6;16(1):355-365.

--- Das Neves Borges P, Vincent TL, Marenzana M. Automated assessment of bone changes in cross-sectional micro-CT studies of murine experimental osteoarthritis. PLoS One. 2017 Mar 23;12(3):e0174294.

--- de Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, van Osch GJ, Zuurmond AM, Schoones J, Toes RE, Huizinga TW, Kloppenburg M. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. Osteoarthritis Cartilage. 2012 Dec;20(12):1484-99.

--- Di Paola R, Cuzzocrea S. Predictivity and sensitivity of animal models of arthritis. Autoimmunity reviews. 2008;8(1):73-5

--- Duke RC, Persechini PM, Chang S, Liu CC, Cohen JJ, Young JD. Purified perforin induces target cell lysis but not DNA fragmentation. J Exp Med. 1989 Oct 1;170(4):1451-6.

--- Fang H, Huang L, Welch I, Norley C, Holdsworth DW, Beier F, Cai D. Early Changes of Articular Cartilage and Subchondral Bone in The DMM Mouse Model of Osteoarthritis. Sci Rep. 2018 Feb 12;8(1):2855.

--- Felson DT. Osteoarthritis as a disease of mechanics. Osteoarthr Cartil 2013; 21:10–5.

--- Fraser SA, Karimi R, Michalak M, Hudig D. Perforin lytic activity is controlled by calreticulin. J Immunol. 2000 Apr 15;164(8):4150-5.

--- Froelich CJ, Pardo J, Simon MM. Granule-associated serine proteases: granzymes might not just be killer proteases. Trends Immunol. 2009 Mar;30(3):117-23.

--- Ganz DA, Chang JT, Roth CP, Guan M, Kamberg CJ, Niu F, Reuben DB, Shekelle PG, Wenger NS, MacLean CH. Quality of osteoarthritis care for community-dwelling older adults. Arthritis Rheum. 2006 Apr 15;55(2):241-7.

--- Garzón-Tituaña M, Arias MA, Sierra-Monzón JL, Morte-Romea E, Santiago L, Ramirez-Labrada A, Martinez-Lostao L, Paño-Pardo JR, Galvez EM, Pardo J. The Multifaceted Function of Granzymes in Sepsis: Some Facts and a Lot to Discover. Front Immunol. 2020 Jun 17;11:1054

--- Glasson SS, Trubetskoy OV, Harlan PM, Chavarria AE, Haimes HB, Jimenez PA. Blotchy mice: a model of osteoarthritis associated with a metabolic defect. Osteoarthritis Cartilage 1996;4:209e12.

--- Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito BA, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Kanki K, Wang E, Peluso D, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. Arthritis Rheum. 2004; 50(8):2547-58.

--- Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA. Less severe OA is observed in the IL-1 beta KO and more severe OA is observed in the MMP-9 and MK2 KO mice in a surgical model of OA. Trans Orthop Res Soc 2005;51:251.

--- Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. Nature. 2005; 434(7033): 644-8.

--- Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the129/SvEv mouse. Osteoarthritis Cartilage 2007; 15: 1061–9.

--- Goldbach-Mansky R, Suson S, Wesley R, Hack CE, El-Gabalawy HS, Tak PP. Raised granzyme B levels are associated with erosions in patients with early rheumatoid factor positive rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2005; 64(5): 715-21.

--- Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. Curr Opin Rheumatol. 2011; 23(5): 471-8.

--- Goping IS, Barry M, Liston P, Sawchuk T, Constantinescu G, Michalak KM, Shostak I, Roberts DL, Hunter AM, Korneluk R, Bleackley RC. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. Immunity. 2003 Mar;18(3):355-65.

--- Granville DJ. Granzymes in disease: bench to bedside. Cell Death Differ. 2010; 17(4): 565-6.

--- Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. Blood. 2004 Nov 1;104(9):2840-8.

--- Haseeb A, Haqqi TM. Immunopathogenesis of osteoarthritis. Clin Immunol. 2013 Mar;146(3):185-96.

--- Hendel A, Hiebert PR, Boivin WA, Williams SJ, Granville DJ. Granzymes in age-related cardiovascular and pulmonary diseases. Cell Death Differ. 2010; 17(4): 596-606.

--- Hendel A, Hsu I, Granville DJ. Granzyme B releases vascular endothelial growth factor from extracellular matrix and induces vascular permeability. Lab Invest. 2014 Jul;94(7):716-25.

--- Hermsen CC, Konijnenberg Y, Mulder L, Loé C, van Deuren M, van der Meer JW, van Mierlo GJ, Eling WM, Hack CE, Sauerwein RW. Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental Plasmodium falciparum infections. Clin Exp Immunol. 2003 Jun;132(3):467-72.

--- Hernandez-Pigeon H, Jean C, Charruyer A, Haure MJ, Titeux M, Tonasso L, Quillet-Mary A, Baudouin C, Charveron M, Laurent G. Human keratinocytes acquire cellular cytotoxicity under UV-B irradiation. Implication of granzyme B and perforin. J Biol Chem. 2006; 281(19): 13525-13532.

--- Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. Cell. 1994 Mar 25;76(6):977-87.

--- Hiebert PR, Boivin WA, Abraham T, Pazooki S, Zhao H, Granville DJ. Granzyme B contributes to extracellular matrix remodeling and skin aging in apolipoprotein E knockout mice. Exp Gerontol. 2011; 46(6): 489-99.

--- Hiebert PR, Granville DJ. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. Trends Mol Med. 2012; 18(12): 732-41.

--- Hirayama T, Danks L, Sabokbar A, Athanasou NA. Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). (2002) 41:1232– 9.

--- Hirst CE, Buzza MS, Sutton VR, Trapani JA, Loveland KL, Bird PI. 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; 7(12): 1133-1142.

--- de Hooge AS, van de Loo FA, Bennink MB, Arntz OJ, de Hooge P, van den Berg WB. Male IL-6 gene knockout mice developed more advanced osteoarthritis upon aging. Osteoarthritis Cartilage 2005;13:66e73.

--- Houard X, Goldring MB, Berenbaum F. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. Curr Rheumatol Rep. 2013; 15(11): 375.

--- Hsu I, Parkinson LG, Shen Y, Toro A, Brown T, Zhao H, Bleackley RC, Granville DJ. Serpina3n accelerates tissue repair in a diabetic mouse model of delayed wound healing. Cell Death Dis. 2014 Oct 9;5(10):e1458.

--- Hussein MR, Aboulhagag NM, Atta HS, Atta SM. Evaluation of the profile of the immune cell infiltrate in lichen planus, discoid lupus erythematosus, and chronic dermatitis. Pathology. 2008 Dec;40(7):682-93.

--- Inacio MCS, Paxton EW, Graves SE, Namba RS, Nemes S. Projected increase in total knee arthroplasty in the United States - an alternative projection model. Osteoarthritis Cartilage. 2017 Nov;25(11):1797-1803.

--- Jacobsen K. Osteoarthrosis following insufficiency of the cruciate ligaments in man. A clinical study. Acta Orthop Scand 1977;48:520e6.

--- Jaime P, García-Guerrero N, Estella R, Pardo J, García-Álvarez F, Martinez-Lostao L. CD56+/CD16- Natural Killer cells expressing the inflammatory protease granzyme A are enriched in synovial fluid from patients with osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 2017; 25(10): 1708-1718.

--- Janeway CA Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1989;54 Pt 1:1-13

--- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Principles of innate and adaptive immunity.

--- Joeckel LT, Wallich R, Martin P, Sanchez-Martinez D, Weber FC, Martin SF, Borner C, Pardo J, Froelich C, Simon MM. Mouse granzyme K has pro-inflammatory potential. Cell Death Differ. 2011 Jul;18(7):1112-9.

--- Joeckel LT, Bird PI. Are all granzymes cytotoxic in vivo? Biol Chem. 2014; 395(2): 181-202.

--- Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. Osteoarthritis Cartilage. 2005 Jul;13(7):632-41.

--- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol. 2011; 7(1): 33-42.

--- Kim HA, Cho ML, Choi HY, Yoon CS, Jhun JY, Oh HJ, Kim HY. The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. Arthritis Rheum. 2006; 54(7): 2152-63.

--- Koizumi H, Liu CC, Zheng LM, Joag SV, Bayne NK, Holoshitz J, Young JD. Expression of perforin and serine esterases by human gamma/delta T cells. J Exp Med. 1991 Feb 1;173(2):499-502.

--- Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. Osteoarthritis Cartilage. 2015; 23(8): 1233-41.

--- Krenacs L, Smyth MJ, Bagdi E, Krenacs T, Kopper L, Rudiger T, Zettl A, Muller-Hermelink HK, Jaffe ES, Raffeld M. 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 May 1;101(9):3590-3.

--- Kummer JA, Tak PP, Brinkman BM, van Tilborg AA, Kamp AM, Verweij CL, Daha MR, Meinders AE, Hack CE, Breedveld FC. Expression of granzymes A and B in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Clin Immunol Immunopathol. 1994 Oct;73(1):88-95.

--- Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. Cell. 2014;157(5):1013-22.

--- Lauw FN, Simpson AJ, Hack CE, Prins JM, Wolbink AM, van Deventer SJ, Chaowagul W, White NJ, van Der Poll T. Soluble granzymes are released during human endotoxemia and in patients with severe infection due to gram-negative bacteria. J Infect Dis. 2000; 182(1): 206-13.

--- Law RH, Lukoyanova N, Voskoboinik I, Caradoc-Davies TT, Baran K, Dunstone MA, D'Angelo ME, Orlova EV, Coulibaly F, Verschoor S, Browne KA, Ciccone A, Kuiper MJ, Bird PI, Trapani JA, Saibil HR, Whisstock JC. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. Nature. 2010 Nov 18;468(7322):447-51.

--- Lichtenheld MG, Olsen KJ, Lu P, Lowrey DM, Hameed A, Hengartner H, Podack ER. Structure and function of human perforin. Nature. 1988 Sep 29;335(6189):448-51.

--- Loeser RF, Olex AL, McNulty MA, Carlson CS, Callahan M, Ferguson C, Fetrow JS. Disease progression and phasic changes in gene expression in a mouse model of osteoarthritis. PLoS One. 2013;8(1):e54633.

--- Ma HL, Blanchet TJ, Peluso D, Hopkins B, Morris EA, Glasson SS. Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model. Osteoarthritis Cartilage. 2007; 15(6): 695-700.

--- Mahr S, Menard J, Krenn V, Muller B. Sexual dimorphism in the osteoarthritis of STR/ort mice may be linked to articular cytokines. Ann Rheum Dis 2003; 62:1234e7.

--- Majumdar MK, Askew R, Schelling S, Stedman N, Blanchet T, Hopkins B, Morris EA, Glasson SS. Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2007 Nov;56(11):3670-4.

--- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. Science. 2002;296(5566):301-5.

--- Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? Clin Cancer Res. 2015; 21(22): 5047-56.

--- Masson D, Tschopp J. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. Cell. 1987;49(5):679-685.

--- Mason RM, Chambers MG, Flannelly J, Gaffen JD, Dudhia J, Bayliss MT. The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 2001;9:85e91.

--- Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol. 1994;12:991-1045.

--- McGuire MJ, Lipsky PE, Thiele DL. Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I. J Biol Chem. 1993 Feb 5;268(4):2458-67.

--- Metkar SS, Menaa C, Pardo J, Wang B, Wallich R, Freudenberg M, Kim S, Raja SM, Shi L, Simon MM, Froelich CJ. Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. Immunity. 2008;29(5): 720-33.

--- Metkar SS, Wang B, Catalan E, Anderluh G, Gilbert RJ, Pardo J, Froelich CJ. Perforin rapidly induces plasma membrane phospholipid flip-flop. PLoS One. 2011;6(9):e24286.

--- Metkar SS, Marchioretto M, Antonini V, Lunelli L, Wang B, Gilbert RJ, Anderluh G, Roth R, Pooga M, Pardo J, Heuser JE, Serra MD, Froelich CJ. Perforin oligomers form arcs in cellular membranes: a locus for intracellular delivery of granzymes. Cell Death Differ. 2015 Jan;22(1):74-85.

--- Miller RE, Miller RJ, Malfait AM. Osteoarthritis joint pain: the cytokine connection. Cytokine. 2014;70(2): 185-93.

--- Mobasheri A, Batt M. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. Ann Phys Rehabil Med. 2016 Dec;59(5-6):333-339.

--- Moilanen T, Sirkkola H, Vuolteenaho K, Moilanen E. A new model of experimental osteoarthritis by cruciate ligament transection in mouse knee. Osteoarthritis Cartilage 2002;10:S55

--- Murphy B, Cisternas G, Pasta J, Helmick CJ, Yelin EH. Medical expenditures and earnings losses among US adults with arthritis in 2013. Arthritis Care Res 2018;70(6):869–76.

--- Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Tschopp J, Gay RE, Gay S. Demonstration of granzyme A and perforin messenger RNA in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1995 Apr;38(4):477-84.

--- Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, Betts MR, Goldschmidt MH, Wilson ME, de Oliveira CI, Scott P. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. PLoS Pathog. 2013;9(7):e1003504.

--- Núñez D, Gálvez EM, Pardo J. 2015. Desarrollo de inmunobiosensores y sistemas de diagnóstico para aplicaciones biomédicas: análisis de la interacción ICAM-1/LFA-1 y detección de aspergilosis invasiva. Tesis-Universidad de Zaragoza thesis. Instituto de Carboquímica, Zaragoza. 13, 314 p. pp.

--- Oegema TR, Visco D. Animal Models of Osteoarthritis. In: An YH, Friedman RJ, Eds. Boca Raton: CRC Press 1999:349e67.

--- Pardo J, Wallich R, Ebnet K, Iden S, Zentgraf H, Martin P, Ekiciler A, Prins A, Müllbacher A, Huber M, Simon MM. 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; 14(10): 1768-79.

--- Pardo J, Wallich R, Martin P, Urban C, Rongvaux A, Flavell RA, Müllbacher A, Borner C, Simon MM. Granzyme B-induced cell death exerted by ex vivo CTL: discriminating requirements for cell death and some of its signs. Cell Death Differ. 2008 Mar;15(3):567-79.

--- Pardo J, Aguilo JI, Anel A, Martin P, Joeckel L, Borner C, Wallich R, Müllbacher A, Froelich CJ, Simon MM. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. Microbes Infect. 2009; 11(4): 452-459.

--- Parkinson LG, Toro A, Zhao H, Brown K, Tebbutt SJ, Granville DJ. Granzyme B mediates both direct and indirect cleavage of extracellular matrix in skin after chronic low-dose ultraviolet light irradiation. Aging Cell. 2015 Feb;14(1):67-77.

--- Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. Cardiovasc Res. 2003 Oct 15;60(1):49-57.

--- Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. Osteoarthritis Cartilage. 2006;14(1):13-29.

--- Qiao J, Zhou M, Li Z, Ren J, Gao G, Zhen J, Cao G, Ding L. Elevated serum granzyme B levels are associated with disease activity and joint damage in patients with rheumatoid arthritis. J Int Med Res. 2020;48(11): 300060520962954.

--- Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, Sokolove J. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol. 2016;12(10):580-92.

--- Roosendaal G, Lafeber FP. Blood-induced joint damage in hemophilia. Semin Thromb Hemost 2003;29:37e42.

--- Roos H, Adalberth T, Dahlberg L, Lohmander LS. Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age. Osteoarthritis Cartilage 1995;3:261e7

--- Rubin BR. Management of osteoarthritic knee pain. J Am Osteopath Assoc. 2005 Sep;105(9 Suppl 4):S23-8.

--- Rucevic M, Fast LD, Jay GD, Trespalcios FM, Sucov A, Siryaporn E, Lim YP. Altered levels and molecular forms of granzyme k in plasma from septic patients. Shock. 2007 May;27(5):488-93.

--- Santiago L, Menaa C, Arias M, Martin P, Jaime-Sánchez P, Metkar S, Comas L, Erill N, Gonzalez-Rumayor V, Esser E, Galvez EM, Raja S, Simon MM, Sprague SM, Gabay C, Martinez-Lostao L, Pardo J, Froelich CJ. Granzyme A Contributes to Inflammatory Arthritis in Mice Through Stimulation of Osteoclastogenesis. Arthritis Rheumatol. 2017; 69(2): 320-334.

--- Sardar S, Andersson Å. Old and new therapeutics for Rheumatoid Arthritis: in vivo models and drug development. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2016;38:2–13.

--- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2010;376:1094–108.

--- Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol. 2010;6:625–635.

--- Shen Y, Cheng F, Sharma M, Merkulova Y, Raithatha SA, Parkinson LG, Zhao H, Westendorf K, Bohunek L, Bozin T, Hsu I, Ang LS, Williams SJ, Bleackley RC, Eriksson JE, Seidman MA, McManus BM, Granville DJ. Granzyme B Deficiency Protects against Angiotensin II-Induced Cardiac Fibrosis. Am J Pathol. 2016;186(1):87-100.

--- Simon HG, Fruth U, Kramer MD, Simon MM. A secretable serine proteinase with highly restricted specificity from cytolytic T lymphocytes inactivates retrovirus-associated reverse transcriptase. FEBS Lett. 1987; 223(2):352-60.

--- Simon MM, Kramer MD, Prester M, Gay S. Mouse T-cell associated serine proteinase 1 degrades collagen type IV: a structural basis for the

migration of lymphocytes through vascular basement membranes. Immunology. 1991 May;73(1):117-9.

--- Sower LE, Klimpel GR, Hanna W, Froelich CJ. Extracellular activities of human granzymes. I. Granzyme A induces IL6 and IL8 production in fibroblast and epithelial cell lines. Cell Immunol. 1996; 171(1):159-63.

--- Spaeny-Dekking EH, Hanna WL, Wolbink AM, Wever PC, Kummer JA, Swaak AJ, Middeldorp JM, Huisman HG, Froelich CJ, Hack CE. Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses in vitro and in vivo. J Immunol. 1998 Apr 1;160(7):3610-6. Erratum in: J Immunol. 2009 Apr 15;182(8):5152.

--- Spaeny-Dekking EH, Kamp AM, Froelich CJ, Hack CE. Extracellular granzyme A, complexed to proteoglycans, is protected against inactivation by protease inhibitors. Blood. 2000; 95(4): 1465-72.

--- Spencer L, Abate D, Abate H, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet 2018;392(10159):1789–858

--- Stefik D, Vranic V, Ivkovic N, Abazovic D, Maric D, Vojvodic D, Supic G. An insight into osteoarthritis susceptibility: Integration of immunological and genetic background. Bosn J Basic Med Sci. 2021 Apr 1;21(2):155-162.

--- Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, Browne KA, Trapani JA. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. J Exp Med. 2000 Nov 20;192(10):1403-14.

--- Tak PP, Spaeny-Dekking L, Kraan MC, Breedveld FC, Froelich CJ, Hack CE. 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 May;116(2):366-70.

--- Teichtahl AJ, Wluka AE, Proietto J, Cicuttini FM. Obesity and the female sex, risk factors for knee osteoarthritis that may be attributable to

systemic or local leptin biosynthesis and its cellular effects. Med Hypotheses 2005;65:312–5.

--- Terlain B, Presle N, Pottie P, Mainard D, Netter P. La leptine: un lien entre obésité et arthrose? [Leptin: a link between obesity and osteoarthritis?]. Bull Acad Natl Med. 2006 Oct;190(7):1421-35; discussion 1435-7, 1475-7. French.

--- Trapani JA. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. Genome Biol. 2001;2(12):REVIEWS3014.

--- Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. Nature reviews Immunology. 2002;2(10):735-47.

--- Tschopp CM, Spiegl N, Didichenko S, Lutmann W, Julius P, Virchow JC, Hack CE, Dahinden CA. Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. Blood. 2006 Oct 1;108(7):2290-9.

--- Turner CT, Lim D, Granville DJ. Granzyme B in skin inflammation and disease. Matrix Biol. 2019 Jan;75-76:126-140.

--- Tveit M, Rosengren BE, Nilsson JÅ, Karlsson MK. Former male elite athletes have a higher prevalence of osteoarthritis and arthroplasty in the hip and knee than expected. Am J Sports Med. 2012 Mar;40(3):527-33.

--- Uranga S, Marinova D, Martin C, Pardo J, Aguilo N. Granzyme A Is Expressed in Mouse Lungs during Mycobacterium tuberculosis Infection but Does Not Contribute to Protection In Vivo. PLoS One. 2016 Apr 7;11(4):e0153028.

--- van Daalen KR, Reijneveld JF, Bovenschen N. Modulation of Inflammation by Extracellular Granzyme A. Front Immunol. 2020 May 19;11:931.

--- van den Bosch MH, Blom AB, Kram V, Maeda A, Sikka S, Gabet Y, Kilts TM, van den Berg WB, van Lent PL, van der Kraan PM, Young MF. WISP1/CCN4 aggravates cartilage degeneration in experimental osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 2017 Nov;25(11):1900-1911.

--- van der Kraan PM, Vitters EL, van de Putte LB, van den Berg WB. Development of osteoarthritic lesions in mice by "metabolic" and "mechanical" alterations in the knee joints. Am J Pathol 1989;135: 1001e14.

--- van der Kraan PM, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Putte LB, van den Berg WB. Degenerative knee joint lesions in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis. J Exp Pathol 1990;71:19e31

--- van der Kraan PM. The Interaction between Joint Inflammation and Cartilage Repair. Tissue Eng Regen Med. 2019;16(4):327-334.

--- van Osch GJ, van der Kraan PM, Vitters EL, Blankevoort L, van den Berg WB. Induction of osteoarthritis by intra-articular injection of collagenase in mice. Strain and sex related differences. Osteoarthritis Cartilage. 1993;1(3):171-7.

--- Vannini F, Spalding T, Andriolo L, Berruto M, Denti M, Espregueira-Mendes J, Menetrey J, Peretti GM, Seil R, Filardo G. Sport and early osteoarthritis: the role of sport in aetiology, progression and treatment of knee osteoarthritis. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2016 Jun;24(6):1786-96.

--- Visco DM, Orevillo CJ, Kammerman J, Kincaid SA, Widmer WR, Christen AJ. Progressive chronic osteoarthritis in a surgically induced model in mice. Trans Orthop Res Soc 1996;21:241.

--- Vlad SC, Neogi T, Aliabadi P, Fontes JDT, Felson DT. No association between markers of inflammation and osteoarthritis of the hands and knees. J Rheumatol. 2011;38(8):1665-70.

--- Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smyth MJ, Trapani JA. 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 Mar 4;280(9):8426-34.

--- Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. Nat Rev Immunol. 2015; 15(6): 388-400.

--- Wallace IJ, Worthington S, Felson DT, Jurmain RD, Wren KT, Maijanen H, Woods RJ, Lieberman DE. Knee osteoarthritis has doubled in prevalence since the mid-20th century. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Aug 29;114(35):9332-9336.

--- Wensink AC, Hack CE, Bovenschen N. Granzymes regulate proinflammatory cytokine responses. J Immunol. 2015;194(2):491-7.

--- Wilson JA, Prow NA, Schroder WA, Ellis JJ, Cumming HE, Gearing LJ, Poo YS, Taylor A, Hertzog PJ, Di Giallonardo F, Hueston L, Le Grand R, Tang B, Le TT, Gardner J, Mahalingam S, Roques P, Bird PI, Suhrbier A. RNA-Seq analysis of chikungunya virus infection and identification of granzyme A as a major promoter of arthritic inflammation. PLoS Pathog. 2017;13(2):e1006155.

--- Xie J, Huang Z, Yu X, Zhou L, Pei F. Clinical implications of macrophage dysfunction in the development of osteoarthritis of the knee. Cytokine Growth Factor Rev. 2019 Apr;46:36-44.

--- Xu L, Liu X, Liu H, Zhu L, Zhu H, Zhang J, Ren L, Wang P, Hu F, Su Y. Impairment of Granzyme B-Producing Regulatory B Cells Correlates with Exacerbated Rheumatoid Arthritis. Front Immunol. 2017 Jun30;8:768.

--- Yang CY, Chanalaris A, Troeberg L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis - looking beyond the 'usual suspects'. Osteoarthritis Cartilage. 2017;25(7):1000-1009.

--- Yoshikawa Y, Hirayasu H, Tsuzuki S, Fushiki T. Granzyme A causes detachment of alveolar epithelial A549 cells accompanied by promotion of interleukin-8 release. Biosci Biotechnol Biochem. 2008 Sep;72(9):2481-4.

--- Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. Clin Geriatr Med. 2010 Aug;26(3):355-69.