

Llpsy Santiago García

Relevancia de la inflamación mediada por la granzima A en autoinmunidad y cáncer

Departamento

Departamento de Microbiología, Pediatría,
Radiología y Salud Pública

Director/es

Pardo Jimeno, Julian

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



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

RELEVANCIA DE LA INFLAMACIÓN MEDIADA POR LA GRANZIMA A EN AUTOINMUNIDAD Y CÁNCER

Autor

Llpsy Santiago García

Director/es

Pardo Jimeno, Julian

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Departamento de Microbiología, Pediatría, Radiología y Salud Pública

2020

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias



**Universidad
Zaragoza**



Tesis doctoral

Relevancia de la inflamación mediada por la granzima A en autoinmunidad y cáncer

Memoria presentada por:

Llpsy Santiago García

Licenciada en Farmacia para optar al grado de
Doctora en Ciencias por la Universidad de Zaragoza

2020



**Universidad
Zaragoza**



Dr. **Julián Pardo Jimeno**, Doctor en Ciencias e Investigador ARAID en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA) de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada: “**Relevancia de la inflamación mediada por la granzima A en autoinmunidad y cáncer**”, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza y en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón bajo mi dirección, y que reúne las condiciones requeridas para que su autora, la Licenciada en Farmacia **Llpsy Santiago García**, pueda optar al Grado de Doctor en Ciencias por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, 14 de febrero de 2020

Fdo. Julián Pardo Jimeno.

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca Universidad de Zaragoza-Banco Santander para Latinoamericanos, curso 2012-2013, y a un contrato predoctoral para la formación de doctores otorgada por el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2014-54763-C2-1-R).

ABREVIATURAS

ACPA:	Anticuerpo antiproteína citrulinada
ANOVA:	Análisis de la varianza
AOM:	Azoximetano
APCs:	Célula presentadora de antígeno
APC:	Gen de la poliposis coli adenomatosa
AR:	Artritis reumatoide
BMDM	Macrófagos derivados de la médula ósea
Breg:	Linfocito B regulador
CAC:	Cáncer asociado a colitis
CAF:	Fibroblasto asociado a cáncer
CCR:	Cáncer colorrectal
CD:	Célula dendrítica
CFA:	Adyuvante completo de Freund
CIA:	Artritis inducida por colágeno
CIN:	Inestabilidad cromosómica
CMS:	Consorcio de subtipos moleculares de CCR
COX-2:	Ciclooxygenasa 2
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DSS:	Sulfato de dextrano sódico
ECM:	Matriz extracelular
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
EII:	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMT:	Transición epitelio mesénquima
FasL:	Ligando de Fas.
FHL:	Linfocitosis hemofagocítica familiar
FLS:	Sinoviocitos tipo fibroblasto
FR:	Factor reumatoideo
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos
Gzms:	Granzimas
HLA:	Antígeno leucocitario humano
HRP:	Peroxidasa de rábano

Abreviaturas

ICTP:	Telopéptido C-terminal de colágeno tipo I
IECs:	Células epiteliales intestinales
IELs:	Linfocitos intraepiteliales
IFA:	Adyuvante incompleto de Freund
IFN:	Interferón
IL:	Interleuquina
ILCs:	Células linfoides innatas
LCMV:	Virus de la linfocoriomeningitis de ratón
LPS:	Lipopolisacárido
M-CSF:	Factor estimulador de colonias de monocitos
MDSC:	Célula supresora de origen mieloide
MHC I:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MHC II:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
min:	Minutos
MMP:	Metaloproteasas
MSI:	Inestabilidad de microsatélites
MTOC:	Centro organizador de microtúbulo
NF- κ B:	Factor nuclear κ B
NK:	Célula asesina natural
NKT:	Célula T asesina natural
OCs:	Osteoclastos
OPG:	Osteoprotegerina
Perf:	Perforina
PFA:	Paraformaldehído
PGE2:	Prostaglandina E2
PRRs:	Receptores de reconocimiento de patrones
RANK:	Receptor activador para el factor nuclear κ B
RANKL:	Ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B
RNA:	Ácido ribonucleico
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RPMI:	Medio roswell park memorial institute
SCNA:	Alteraciones somáticas del número de copias
SEM:	Error estándar de la media

Abreviaturas

SFB:	Suero fetal bovino
STAT3:	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
T $\gamma\delta$:	Linfocito T $\gamma\delta$
TAM:	Macrófago asociado a tumor
Tc:	Linfocito T citotóxico
TCR:	Receptor de antígeno de células T
TGF- β :	Factor de crecimiento transformante β
TLR:	Receptor tipo Toll
TNF:	Factor de necrosis tumoral
TNFR:	Receptor del factor de necrosis tumoral
TNM:	Clasificación de CCR según tumor, ganglios linfáticos, metástasis
TRAP:	Actividad de la fosfatasa ácida tartrato resistente
Treg:	Célula T reguladora
UC:	Colitis ulcerativa
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular

Índice

1- INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Inflamación en autoinmunidad y cáncer</i>	1
1.2 <i>Mecanismos de citotoxicidad de las células efectoras del sistema inmunitario</i>	3
1.2.1 Exocitosis granular	3
1.2.1.1 Perforina (Perf)	5
1.2.1.2 Granzimas (Gzms)	9
1.2.2 Inhibidores de Gzms: Serpinas	20
1.3 <i>Artritis reumatoide</i>	23
1.3.1 Epidemiología	23
1.3.2 Etiología	24
1.3.2.1 Factores genéticos	24
1.3.3 Sistema inmunitario y AR	25
1.3.3.1 Autoanticuerpos en la patogenia de la AR	25
1.3.3.2 Fisiopatología de la AR	26
1.3.3.3 Papel patogénico de las células del sistema inmunitario en la AR	28
1.3.3.4 Citoquinas en AR	36
1.3.4 Modelos murinos para el estudio de AR	38
1.3.4.1 CIA	40
1.4 <i>Cáncer colorrectal</i>	44
1.4.1 Epidemiología	44
1.4.2 Clasificación	45
1.4.2.1 Estadificación	45
1.4.2.2 Clasificación según los Subtipos Moleculares de Consenso de CCR (CMSs)	46
1.4.3 Etiología. Factores de riesgo	47
1.4.3.1 Factores hereditarios	47
1.4.3.2 Factores ambientales o factores relacionados con el estilo de vida	48
1.4.3.3 Antecedentes médicos personales	49
1.4.4 Mecanismos mutacionales asociados al desarrollo de CCR	51
1.4.4.1 Mecanismos epigenéticos	51
1.4.4.2 CIN	51
1.4.4.3 MSI	52
1.4.5 Inflamación y cáncer colorrectal	52

Índice

1.4.5.1 patogenia molecular del CAC. Diferencias con el CCR esporádico y hereditario -----	53
1.4.5.2 Inflamación en la iniciación de CAC-----	54
1.4.5.3 Inflamación en la progresión de CAC -----	55
1.4.5.4 Inflamación en la invasión y metástasis del CAC -----	57
1.4.5.5 Citoquinas en CCR -----	58
1.4.5.6 La vía COX-2/PGE2: inflamación y tumorigénesis colorrectal -----	69
1.4.6 Células del sistema inmunitario en CCR -----	70
1.4.7 Papel de la microbiota intestinal en el desarrollo del cáncer -----	73
1.4.8 Modelos experimentales para el estudio de CCR-----	75
1.4.8.1 Modelos <i>in vivo</i> -----	75
1.4.8.2 AOM -----	76
1.4.8.3 Modelo de CAC. DSS/AOM -----	77
2- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS -----	79
<i>Objetivos</i> -----	82
3- MATERIALES Y MÉTODOS -----	85
3.1 <i>Experimentos in vivo</i> -----	85
3.1.1 Ratones -----	85
3.1.1.1 Determinación del genotipo de los ratones-----	85
3.1.2 Artritis inducida por colágeno (CIA) -----	88
3.1.2.1 Preparación de la emulsión -----	88
3.1.2.2 Inmunización-----	88
3.1.2.3 Monitorización y evaluación de la severidad de la artritis-----	89
3.1.2.4 Anatomía patológica e inmunohistoquímica-----	89
3.1.2.5 Análisis de proliferación de células T (incorporación de 3H-timidina)-	90
3.1.2.6 Ensayo de formación de fosas -----	91
3.1.3 Colitis y cáncer asociado a colitis -----	91
3.1.3.1 Inducción de colitis crónica y aguda -----	91
3.1.3.2 Inducción de cáncer asociado a colitis (CAC) -----	92
3.1.3.3 Puntuación clínica -----	94
3.1.3.4 Puntuación del daño macroscópico -----	94
3.1.3.5 Evaluación histológica de la inflamación -----	95
3.1.3.6 Determinación del grado tumoral -----	95
3.1.3.7 Estudio inmunohistoquímico de marcadores de proliferación y EMT -	96

Índice

3.1.3.8 Estudio de la permeabilidad intestinal en ratones wt y GzmA ^{-/-} -----	97
3.1.3.9 Aislamiento de linfocitos intraepiteliales (IELs) -----	98
3.1.3.10 Composición de microbiota intestinal -----	98
3.2 <i>Análisis de la expresión de proteínas</i> -----	99
3.2.1 Extracción de proteínas totales a partir del tejido congelado-----	99
3.2.2 Ensayo colorimétrico Bradford para estimar la concentración de proteínas	100
3.2.3 Cuantificación de proteínas por ELISA -----	100
3.2.3.1 Cuantificación de Citoquinas por ELISA -----	100
3.2.3.2 Cuantificación de GzmA por ELISA -----	101
3.2.3.3 Cuantificación Telopéptido C-terminal de colágeno tipo I (ICTP) por ELISA-----	102
3.2.3.4 Cuantificación de anticuerpos IgG anti colágeno tipo II por ELISA --	102
3.2.4 Análisis de proteínas por Western-Blot-----	103
3.2.4.1 Extracción de proteínas totales a partir de lisados celulares-----	103
3.2.4.2 Separación de proteínas celulares. Electroforesis en gel de poliacrilamida-----	104
3.2.4.3 Transferencia de proteínas a membranas-----	104
3.2.4.4 Análisis de proteínas por inmunoblot (Western blotting) -----	104
3.2.5 Análisis de proteínas de la superficie celular por citometría de flujo -----	106
3.2.5.1 Análisis intracelular de GzmA por citometría de flujo -----	106
3.3 <i>Sobreexpresión y purificación de proteínas</i> -----	107
3.3.1 Preparación de medios y cultivos de <i>Escherichia coli</i> y <i>Pichia pastoris</i> ----	107
3.3.2 Expresión y purificación de GzmA en <i>Escherichia coli</i> -----	108
3.3.2.1 Inducción con IPTG -----	108
3.3.2.2 Obtención de cuerpos de inclusión-----	109
3.3.2.3 Solubilización y replegamiento de las proteínas contenidas en los cuerpos de inclusión -----	109
3.3.2.4 Purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico -----	110
3.3.2.5 Activación de la pro-GzmA -----	111
3.3.2.6 Determinación de la actividad enzimática de la proteína GzmA -----	111
3.3.3 Expresión y purificación de Serpinb6b en <i>Pichia pastoris</i> .-----	112
3.3.3.1 Inducción con metanol -----	112
3.3.3.2 Lisis del pellet celular -----	113
3.3.3.3 Purificación mediante cromatografía de afinidad por níquel -----	113

Índice

3.4 Cuantificación de Prostaglandina E2 por ELISA-----	114
3.5 Análisis de la expresión génica -----	114
3.5.1 Extracción de RNA y determinación de la expresión génica mediante RT-qPCR-----	114
3.6 Cultivos celulares-----	115
3.6.1 Líneas celulares-----	116
3.6.2 Mantenimiento de los cultivos celulares -----	116
3.6.3 Congelación y descongelación de células -----	117
3.6.4 Contaje y determinación de la viabilidad celular -----	118
3.6.5 Inactivación del complemento en el suero fetal bovino -----	118
3.6.6 Generación de OCs a partir de diferentes precursores-----	118
3.6.7 Generación de macrófagos M1 derivados de la médula ósea (BMDM) ----	120
3.6.8 Análisis de la expresión de IL-6 inducida por GzmA extracelular en macrófagos M1 -----	121
3.6.9 Activación <i>in vitro</i> de las vías p-STAT3 y NFkB en MC-38 -----	121
3.7 Determinación de la correlación entre GZMA e inflamación en muestras de CCR humano-----	122
3.8 Análisis estadístico -----	123
4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	124
4.1 Artritis inducida por colágeno. Papel de la GzmA en el modelo CIA -----	124
4.1.1 Evaluación de la severidad de la enfermedad -----	124
4.1.2 Estudio de anatomía patológica-----	125
4.1.3 Respuesta inflamatoria <i>in vivo</i> durante CIA -----	128
4.1.4 Expresión de GzmA durante CIA -----	129
4.1.5 Respuesta <i>in vivo</i> de células B al colágeno tipo II: -----	130
4.1.6 Respuesta <i>in vitro</i> de células T al colágeno tipo II -----	131
4.1.7 Estudio de la osteoclastogénesis <i>in vivo</i> durante CIA -----	134
4.1.8 Estudio de la osteoclastogénesis <i>in vitro</i> -----	137
4.1.9 Mecanismo de la formación de OCs inducida por GzmA -----	143
4.1.10 Discusión-----	147
4.2 Colitis y CAC. Papel de la GzmA en el modelo DSS y DSS/AOM. -----	153
4.2.1 GzmA activa incrementada en el tejido de colon de animales tratados con DSS y DSS/AOM-----	153

Índice

4.2.2 Evaluación de la colitis ulcerativa crónica <i>in vivo</i> -----	156
4.2.3 Evaluación del daño macroscópico y microscópico en UC crónica <i>in vivo</i> -----	157
4.2.4 Cuantificación de citoquinas inflamatorias en explantes de cultivo de tejido de colon de ratones wt y GzmA ^{-/-} durante colitis crónica-----	159
4.2.5 Evaluación del papel de la GzmA durante la colitis aguda <i>in vivo</i> : Puntuación clínica, pérdida de peso y evaluación del daño macroscópico-----	161
4.2.6 Cuantificación de citoquinas en explantes de cultivo de tejido de colon de ratones wt y GzmA ^{-/-} durante colitis aguda -----	163
4.2.7 Cáncer asociado a colitis en un modelo <i>in vivo</i> . Evaluación de la severidad de la enfermedad y del daño a nivel macroscópico-----	165
4.2.8 Evaluación del daño histológico, de los tumores y del grado tumoral-----	166
4.2.9 Estudio de marcadores de EMT y proliferación tumoral-----	170
4.2.10 Estudio de la inflamación y la actividad de la COX-2 en explantes de cultivo de tejido de colon de ratones wt y GzmA ^{-/-} durante el desarrollo del CCR -----	174
4.2.11 Papel de la microbiota intestinal en el CCR <i>in vivo</i> -----	176
4.2.12 Estudio del papel de la Perf y la GzmB durante el desarrollo del CCR inducido con DSS/AOM-----	178
4.2.13 La producción de IL-6 y TNF- α inducida por GzmA extracelular en macrófagos M1 incrementa la expresión de p-STAT3 y p-NF-kB en la línea celular de CCR MC38 -----	181
4.2.14 Estudio de la inhibición <i>in vivo</i> de la IL-6 y del TNF- α durante el CAC inducido por DSS/AOM -----	184
4.2.15 Estudio del papel de la inhibición terapéutica <i>in vivo</i> de la GzmA durante el CAC inducido por DSS/AOM -----	189
4.2.16 Correlación positiva entre expresión de GZMA e inflamación en muestras humanas de CCR -----	190
4.2.17 Discusión-----	193
5- CONCLUSIONES -----	199
6- BIBLIOGRAFÍA -----	201

INTRODUCCIÓN

1- INTRODUCCIÓN

1.1 Inflamación en autoinmunidad y cáncer

El sistema inmunitario protege al organismo de las infecciones y del desarrollo del cáncer, manteniendo la tolerancia hacia los tejidos propios sanos y las sustancias exógenas no dañinas, evitando reacciones autoinmunes y otros trastornos inflamatorios. Para llevar a cabo este objetivo cuenta con diversas células, tejidos y una amplia gama de moléculas solubles.

El sistema inmunitario responde a señales de peligro endógenas y exógenas (1). Las señales de peligro desencadenadas por moléculas microbianas extrañas son conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés “Pathogen-Associated Molecular Patterns”). Por su parte, las señales de peligro desencadenadas por componentes celulares, liberados tras una lesión o muerte celular, son conocidos como patrones moleculares asociados a daños (DAMPs, del inglés “Damage-Associated Molecular Patterns”) (1). Tanto los PAMPs como los DAMPs son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés “Pattern-Recognition Receptors”) (2), expresados por diferentes tipos celulares, lo que desencadena la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1 α/β , IL-18, IL-6 y TNF- α (3, 4). La producción de estas citoquinas estimula la activación y/o perpetuación de la respuesta inmunitaria, incluidas las respuestas humorales (generación de anticuerpos) y celulares, que en última instancia son responsables de eliminar la célula afectada y/o el patógeno.

La inflamación es parte de una respuesta biológica compleja al daño celular o a una infección, a través de la cual el sistema inmunitario intenta eliminar o neutralizar los estímulos perjudiciales, iniciando procesos de curación y regeneración en los tejidos dañados. Aunque el papel beneficioso de la inflamación es defender al huésped y asegurar su supervivencia, una inflamación no resuelta frente a estímulos continuos suscita una respuesta inflamatoria crónica, que sustenta muchos trastornos como enfermedad cardíaca o accidente cerebrovascular. También puede conducir a trastornos autoinmunes, como la artritis reumatoide y el lupus, así como a la génesis y progresión de diferentes

tipos de cáncer (5, 6). Desafortunadamente, los mecanismos moleculares que median en la eliminación de patógenos y tumores son los mismos que intervienen en las enfermedades inflamatorias y autoinmunes (7-11). Así, el equilibrio entre la señalización pro y antiinflamatoria durante la respuesta inmunitaria del huésped es el punto crucial que dicta la eliminación del patógeno y la resolución de la inflamación o, al contrario, la perpetuación de la inflamación y la enfermedad (Figura 1.1).

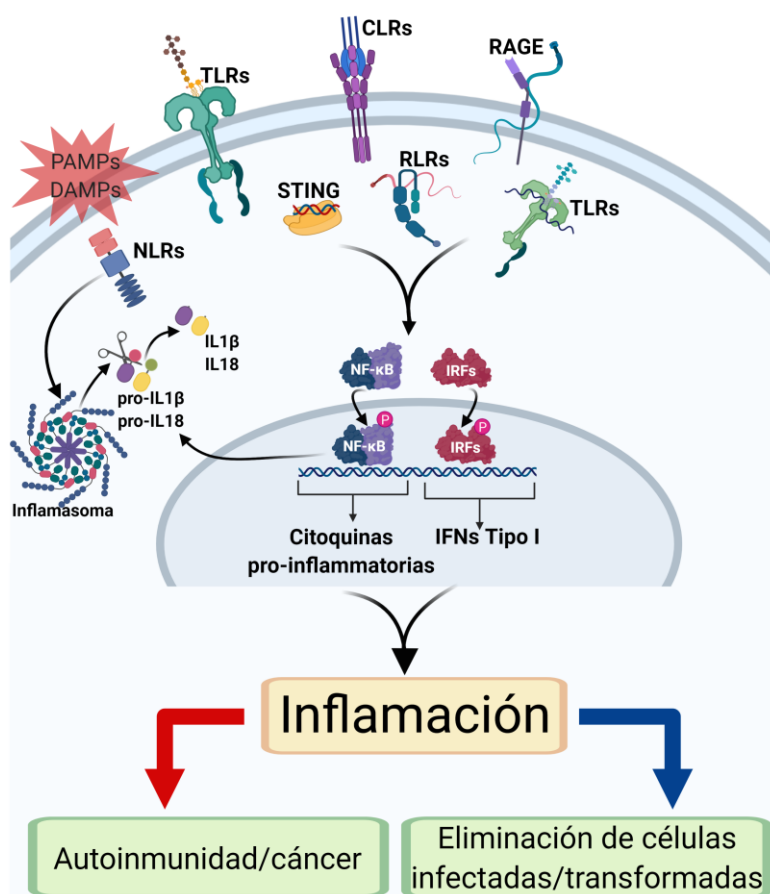


Figura 1.1 Principales rutas de inflamación que conllevan a la activación de respuestas protectoras o dañinas. TLRs: receptores tipo toll (del inglés, "Toll-Like Receptors"). CLR: receptores de lectina tipo C (del inglés, "C-type Lectin Receptors"). RAGE: receptor de los productos avanzados de la glicación (del inglés, "Receptor for Advanced Glycation end Products"). NLRs: receptores tipo NOD (del inglés, "NOD-Like Receptors"). RLRs: receptores de tipo RIG-I (del inglés, "Retinoic acid-Inducible Gene 1"). STING: estimulador de los genes de interferón (del inglés, "Stimulator of Interferon Genes"). NF-κB: factor nuclear kappa B (del inglés, "Nuclear Factor kappa B"). IRFs: factores reguladores del interferón (del inglés, "Interferon Regulatory Factors").

1.2 Mecanismos de citotoxicidad de las células efectoras del sistema inmunitario

La principal función de las células citotóxicas es la de eliminar células infectadas o transformadas. A su vez, estas células pueden estar implicadas en el daño asociado a enfermedades inflamatorias y autoinmunes al ser importantes productoras de citoquinas. También pueden inducir a otros grupos celulares para que produzcan más citoquinas, favoreciendo de esta forma la perpetuación de un ambiente inflamatorio. Dentro de las células citotóxicas se encuentran las células asesinas naturales (NK, del inglés “Natural Killer”), las células T asesinas naturales o células NKT (del inglés, “Natural Killer T cells”), los linfocitos T citotóxicos (Tc o T CD8⁺) y los linfocitos T γ δ .

Las células NK, células NKT, los linfocitos T γ δ y los linfocitos T CD8⁺ ejercen sus funciones citotóxicas sobre las células transformadas o infectadas a través de tres mecanismos comunes (12, 13):

1. Secreción de citoquinas como IFN- γ y TNF- α .
2. Unión de los ligandos de muerte (FasL, TRAIL/Apo2L, TNF- α) a sus receptores correspondientes, expresados en las células diana (Fas/CD95, DR4/DR5, TNFR1).
3. La exocitosis granular.

1.2.1 Exocitosis granular

La exocitosis granular consiste en la liberación de perforina (Perf, una proteína formadora de poros), y granzimas (Gzms), que son proteínas de la familia de serina proteasas. La Perf facilita la entrada de Gzms al interior de la célula diana, permitiendo que estas enzimas cumplan sus funciones biológicas intracelulares.

Este proceso ocurre en varias etapas (14, 15):

1. Sinapsis citotóxica entre la célula efectora y su célula diana. Proceso que se asemeja a la sinapsis inmunológica que se forma entre una célula T CD4⁺ y una célula presentadora de antígeno (APCs, del inglés “Antigen-Presenting Cells”) (16, 17).

2. Migración de los gránulos citotóxicos, anclados a microtúbulos, y del centro organizador de microtúbulos (MTOC, del inglés “MicroTubule-Organizing Center”) hacia la sinapsis inmunológica.
3. Fusión de los gránulos citotóxicos con la membrana plasmática de las células efectoras, y liberación de su contenido hacia la célula diana.

El primer paso para que se produzca la exocitosis granular es el reconocimiento de la célula diana. Este reconocimiento se produce a través del receptor de linfocitos T (TCR, del inglés “T Cell Receptor”) en el caso de los linfocitos Tc, o a través de los receptores de activación en las células NK. Cuando dicho proceso se ha llevado a cabo, la célula citotóxica se adhiere a la célula diana a través de integrinas como LFA-1 (del inglés, “Lymphocyte Function-associated Antigen 1”), que reconocen moléculas de adhesión como ICAM-1 (del inglés, “Intercellular Adhesion Molecule 1”), en la superficie de ésta (18, 19). Esta unión se conoce como sinapsis inmunológica o agrupación supramolecular de activación (SMAC, del inglés “Supra Molecular Activation Cluster”).

Para que este proceso tenga lugar, son necesarias la polimerización de la actina y la reorganización del citoesqueleto en la sinapsis. Esta reorganización implica la acumulación de filamentos de actina (F-actina) en la región periférica de SMAC (del inglés “Supramolecular Activation Cluster”), pSMAC, mientras que la región central de SMAC (cSMAC) permanece en gran parte libre de actina, permitiendo a los gránulos citotóxicos entrar en contacto directo con la membrana plasmática en esta región (20, 21).

La reorientación de MTOC depende de la señalización de proteínas como ZAP70, LAT, Fyn o SLP76, implicadas en la transducción de señales en los linfocitos Tc y en las células NK (22, 23). MTOC produce una red de microtúbulos de tubulina orientados hacia la célula diana, que permiten la translocación de los gránulos hacia la sinapsis (24). Seguidamente, proteínas como AP-3, Rab27a y Munc13-4 permiten el movimiento y la liberación de los gránulos, así como la fusión de estos con la membrana plasmática (20, 25-27).

En último lugar, la esfingomielinasa ácida proporciona elasticidad a la membrana permitiendo que el contenido del gránulo sea expulsado direccionalmente (28).

Los gránulos citotóxicos están compuestos tanto por proteínas que únicamente se encuentran en este tipo de gránulos, como por otras que se encuentran también en los lisosomas. En la tabla 1.1 se resume el contenido de los gránulos citotóxicos, así como la función principal de cada una de estas proteínas.

Molécula	Función
Perforina	Formación de poros
Granzimas	Proteasas de serina
Granulisinina *	Agente antimicrobiano
Calreticulina	Inhibidor de la perforina
Catepsina C	Activación de las granzimas
Serglicina	Unión a granzimas
Catepsina B	Degradación de la perforina
Serpinas	Inhibidores de granzimas
Esfingomielinasa ácida	Degradación esfingomielina/exocitosis granular
Catepsina D	Proteasa
Catepsina L	Proteasa
Receptor de manosa 6-fosfato	Tráfico de proteínas
ATPasa-H ⁺	Acidificador de los gránulos
Arilsulfatasa	Degradación de polisacáridos
β- Hexosamidasa	Degradación de polisacáridos
β- Glucoronidasa	Degradación de polisacáridos
CD63	Marcador lisosomal
Lamp 1	Marcador lisosomal

Tabla 1.1 Contenido de los gránulos citotóxicos.*Expresado en rumiantes y primates y ausente en roedores.

1.2.1.1 Perforina

La perforina (Perf) es una proteína formadora de poros, que media en la muerte de las células diana. Su peso es aproximadamente 67 kDa y se almacena en los gránulos citotóxicos de las células NK, células NKT, linfocitos Tc y linfocitos Tγδ

La Perf es una proteína altamente conservada desde los primates hasta los peces (29), y es crucial para la función de los demás componentes involucrados en la muerte celular mediada por la exocitosis granular, en particular para la familia de las Gzms. Estas se liberan junto con Perf después de la formación de la sinapsis inmunológica (30-32). Con el uso de ratones deficientes en Perf, se ha demostrado la importancia de esta proteína al verse muy comprometida la capacidad citotóxica de los linfocitos (33), siendo estos ratones más sensibles a infecciones virales y al desarrollo de tumores (34). Se ha demostrado, además, que los ratones deficientes en Perf infectados con altas dosis del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) desarrollaban linfohistiocitosis hemofagocítica, similar a la linfohistiocitosis hemofagocítica familiar (FHL, del inglés “Familial Haemophagocytic Lymphohistiocytosis”) en humanos (33).

La Perf presenta homología estructural con la proteína C9 del complemento, responsable de la formación del complejo de ataque a membrana (MAC, del inglés “Membrane Attack Complex”). Posee un dominio N-terminal con actividad lítica, un fragmento de 150 aminoácidos con función desconocida, un dominio central que forma una estructura de hélice α -anfipática por la que se inserta a la membrana, un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés “Epidermal Growth Factor”) y un dominio C2 en el extremo C-terminal de unión a Ca^{2+} , determinante para su activación (35, 36).

La Perf se mantiene inactiva en el interior de los linfocitos citotóxicos. Su actividad depende del pH y de la concentración de Ca^{2+} . La glicosilación de su zona C-terminal le impide la unión con Ca^{2+} (34, 37). Por otro lado, el bajo pH ($\text{pH} \leq 5$) en los gránulos citotóxicos, mantiene protonados residuos de aspartato del dominio C2, impidiendo también su unión con el Ca^{2+} intracelular. Además, la proteína calreticulina actúa como chaperona, manteniéndola en su conformación inactiva (38). La Perf se activa en las condiciones de pH neutro de la sinapsis inmunológica. Con respecto al Ca^{2+} , la Perf necesita como mínimo una concentración de 100 μM de Ca^{2+} para unirse eficientemente a la membrana de la célula diana. En el medio extracelular, las elevadas concentraciones de Ca^{2+} permiten que la Perf se una a este por el dominio C2, lo que induce un cambio de conformación que le permite a esta proteína unirse a la membrana de la

célula diana y a otros monómeros de Perf, formando un poro de entre 5-20 nm de diámetro (34, 36, 39).

No está claro si la Perf en condiciones fisiológicas es suficiente para provocar la muerte en las células diana debido a que éstas son capaces de reparar el poro, bien por endocitosis, o bien movilizand o membranas internas (40). La Perf provoca la muerte de una célula por necrosis cuando se adiciona *in vitro* a altas concentraciones (41). La función de esta proteína sería permitir la entrada de las Gzms al interior de las células diana, las que serán responsables de inducir muerte celular (34, 37).

La catepsina B proteoliza a la Perf, siendo este uno de los mecanismos de protección con que cuentan los linfocitos citotóxicos, que deben de ser capaces de prevenir los efectos citotóxicos de la Perf y las Gzms (42). Esta proteasa quedaría expuesta en la cara externa de la membrana del linfocito tras la degranulación y, de esta forma, degradaría a la Perf que se hubiera podido unir a la membrana del linfocito, antes de que forme el poro (43). Sin embargo, este mecanismo no se ha podido confirmar con el uso de ratones deficientes en catepsina B (44). El marcador lisosomal CD107a (Lamp1), también podría actuar como defensa frente a la acción de la Perf en los linfocitos, al quedar también en la cara externa de la membrana y formar una barrera que impediría la acción de la Perf (45). Por último, la SerpinaB9, un inhibidor de GzmB presente en los gránulos, podría proteger a los linfocitos de la acción de la GzmB (46).

Mecanismos propuestos para la acción de Perf

El mecanismo a través del cual la Perf permite la entrada de Gzms al interior de la célula diana, todavía no se ha elucidado completamente. Varios modelos han sido propuestos para explicar dicho mecanismo, todos basados en las propiedades membranolíticas de la Perf (Figura 1.2).

En el mecanismo más simple, la Perf crea poros (16-22 nm) en la membrana de la célula diana, a través de los cuales las Gzms entran en dicha célula (47-51). Sin embargo, estudios en los que se ha usado Perf recombinante, indicaron que los poros formados no permitían el paso de proteínas mucho más pequeñas que las Gzms (52).

Una teoría alternativa sugiere que la Perf y las Gzms se unen a la membrana de la célula diana y se internalizan rápidamente en endosomas y posteriormente la Perf forma poros en la membrana del endosoma, liberándose Gzms al citosol. Inicialmente se propuso que el receptor de manosa 6 fosfato podría ser responsable de la unión de las Gzms a la membrana para su posterior endocitosis (53). Sin embargo, se ha demostrado que en células deficientes en este receptor, se produce igualmente la entrada de las Gzms (54). También se planteó que la unión de las Gzms a la membrana no depende de receptor, sino de la carga neta positiva de estas proteasas (55, 56).

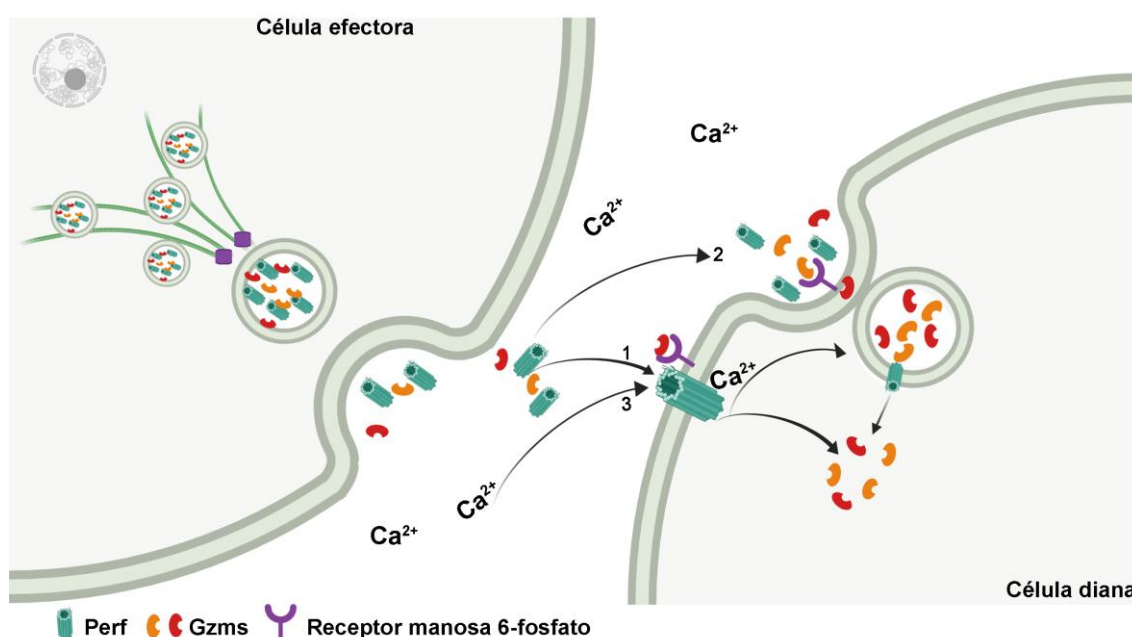


Figura 1.2 Mecanismos de acción propuestos para la Perf. Se indican los tres tipos de mecanismos propuestos (1, 2 y 3) según lo descrito en el texto.

Más recientemente, ha surgido una teoría híbrida que sugiere que la Perf forma poros en la membrana plasmática de la célula diana, lo que permite la entrada de Ca^{2+} . Este aumento de Ca^{2+} intracelular induce mecanismos de reparación en los que los lisosomas y endosomas se fusionan con la membrana plasmática con el fin de sellarla, produciéndose la endocitosis de la Perf junto con las Gzms (57). En el citosol se forman endosomas de gran tamaño donde las Gzms son liberadas por un proceso no conocido que requiere de la formación de poro por la Perf (58).

1.2.1.2 Granzimas

Las granzimas (Gzms, enzimas asociadas a gránulos) son una familia de proteasas descubiertas en los años 80 (59, 60), originalmente identificadas en gránulos citosólicos (lisosomas secretores especializados o gránulos citotóxicos) de linfocitos Tc y células NK. La Perf, GzmA y GzmB son los constituyentes predominantes de los gránulos citotóxicos. Sin embargo, se han descrito otras Gzms menos abundantes, con posible significado funcional y con acciones biológicas no esclarecidas del todo, denominadas Gzms huérfanas (12, 34, 61). Se han encontrado Gzms en células de origen hematopoyético y no hematopoyético, fundamentalmente en linfocitos T CD8⁺ y células NK, pero también en otros grupos celulares como linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos T CD4⁺, células T reguladoras (Treg), macrófagos, basófilos, mastocitos, espermatozoides, células de sertoli, queratinocitos, neumocitos, macrófagos alveolares y células epiteliales alveolares (62-69). Hasta la fecha, se han descrito 5 Gzms en humanos (A, B, H, K, y M) y 10 en ratón (A, B, C, D, E, F, G, K, M y N), siendo la GzmA y la GzmB las más abundantes y mejor caracterizadas (13). Las Gzms se clasifican según su especificidad de corte y su actividad proteolítica. Estas proteasas están reguladas por miembros de la familia de las serpinas (inhibidores de serina proteasas), que evitan la autolesión de la célula efectora (70). En la tabla 1.2 se muestran las Gzms expresadas en células de origen humano y murino, así como la actividad proteolítica, la especificidad de corte y las células que las expresan, tanto *in vivo* como *ex vivo*.

Las Gzms son sintetizadas como zimógenos y en su extremo N-terminal poseen una secuencia de dos aminoácidos (Gly-Glu o Glu-Glu) que deben ser proteolizados para ser activadas. Posteriormente son transportadas del retículo endoplasmático (RE) al aparato de Golgi y de allí dirigidas a los gránulos citotóxicos. En su interior, la proteasa catepsina C (dipeptidil peptidasa I) degrada su secuencia N-terminal, activándolas. Las Gzms permanecen inactivas en el interior de los gránulos debido al pH bajo y a la formación de complejos con proteoglicanos como la serglycina (GzmB) y el sulfato de heparina (GzmA) (71).

Gzm	Especie	Actividad	Especificidad de corte	Tipo Celular
GzmA	h,m	Triptasa	Arg, Lys	Tc, Treg, NK, NKT, GMC, Pne, Malv
GzmB	h,m	ASPasa	Asp > Glu	Tc, Treg, NK, NKT, Mas, MDSCs (h), Bas (h), MØ (h), CDs, GMC, B cell (h), Ser, Pne, Quer
GzmC	m	Quimasa	Asn o Ser*	NK
GzmD	m	Quimasa	Phe, Leu	GMC
GzmE	m	Quimasa	Phe, Leu*	GMC
GzmF	m	Quimasa	Phe, Leu*	GMC
GzmG	m	Quimasa	Phe, Leu*	GMC
GzmH	h	Quimasa	Phe > Tyr	NK
GzmK	h,m	Triptasa	Arg, Lys	Tc, NK, NKT (h), NK (h, CD56 ^{Bright})
GzmM	h, m	METasa	Met > Leu	NK, NKT, Tγδ.
GzmN	m	?	?	Sper

Tabla 1.2 Gzms expresadas en células de origen humano y murino. Tc: Linfocitos T citotóxicos (CD8+ Tαβ, CD8+ Tγδ, CD8- Tγδ). NK: Células NK. NKT: Células NKT. MDSCs: Células Supresoras de Origen Mieloide (del inglés “Myeloid-Derived Suppressor Cells”). Mas: mastocitos. Treg: Células T CD4+ reguladoras. Bas: basófilos. MØ: macrófagos. CDs: Células Dendríticas. Ser: Células de Sertoli. Sper: Espermatozoides. GMC: Células de la glándula metrial. Pne: neumocitos. Malv: Macrófagos alveolares. Quer: queratinocitos. * Hipotético pero no determinado experimentalmente.

Una vez en el citosol de la célula diana, las Gzms ejercen sus funciones biológicas al cortar sustratos intracelulares cruciales que controlan la muerte celular (72, 73), la replicación viral (74) o la inflamación (75). También, algunas Gzms pueden liberarse al medio extracelular (65, 76), donde escinden proteínas de la matriz extracelular (ECM, del inglés “Extracellular Matrix”), de la unión celular y de la superficie celular. Este proceso está implicado en la angiogénesis e integridad vascular, la trans migración linfocitaria, la función de barrera, la inflamación o el envejecimiento y cicatrización de la piel, así como en las enfermedades ampollas autoinmunes (pénfigo) (77-86). No obstante, en la actualidad, el papel exacto de cada Gzm en la muerte celular, la inflamación, o ambas, no está completamente descrito. En la tabla 1.3 se muestra una lista de varios de los sustratos extracelulares identificados para GzmA y GzmB (87).

Sustrato	Función propuesta/comentarios
GzmA	
Fibronectina	Migración de linfocitos
Activador de plasminógeno pro-uroquinasa	Migración de linfocitos a través de coágulos de fibrina
Colágeno IV	Migración de linfocitos
Proteína básica de mielina	Patogénesis de la esclerosis múltiple
Proteoglicanos de membrana basal	Migración de linfocitos Liberación del factor básico de crecimiento de fibroblastos
Receptor similar a la trombina en neuritas	Retracción de neuritas
Desconocido	Activación de monocitos Producción de citoquinas por monocitos, fibroblastos y células epiteliales
Receptor de trombina (PAR-1??)	Desensibilización de plaquetas
Receptor Activado por Proteasa 2 (PAR-2, del inglés "Protease-Activated Receptor 2")	Patogénesis de la colitis infecciosa
GzmB	
Proteoglicanos de agregano (cartílago)	Patogénesis de la artritis reumatoide
Receptor de glutamato neuronal	Generación de autoantígenos en la encefalitis de Rasmussen
Fibronectina (células musculares lisas)	Muerte de células musculares independiente de la Perf Patogénesis de la aterosclerosis
Vitronectina, fibronectina, laminina	Muerte de células endoteliales independiente de la Perf Inhibición de la migración de células tumorales, migración de linfocitos

Tabla 1.3 Sustratos extracelulares de GzmA y GzmB. Adaptado de (87).

Granzima B

La GzmB desempeña un papel relevante en la inducción de apoptosis. Esta serían proteasa corta residuos de ácido aspártico, siendo la caspasa-3 y la caspasa-7 alguno de sus sustratos intracelulares. La escisión de dichas caspasas induce la muerte celular por apoptosis (88).

La GzmB puede inducir apoptosis a través de dos mecanismos: activando directamente a las caspasas (89, 90) o a través de la vía apoptótica mitocondrial (89, 91-94) (Figura 1.3).

En experimentos realizados *in vitro* se ha observado que la GzmB humana muestra más afinidad por Bid, mientras que la de ratón es más afín a la caspasa-3 (95-97).

Inicialmente, se demostró *in vitro* que la GzmB purificada era capaz de activar directamente a la caspasa-3 (98). Asimismo se ha confirmado *in vitro*, que la GzmB puede activar a las caspasas-7, 8 y 10 (99).

También se ha descrito que, al igual que la caspasa-3, la GzmB puede procesar directamente, y sin la mediación de las caspasas, al inhibidor de la DNAsa activada por caspasas (ICAD), provocando la activación de CAD y posterior fragmentación del DNA (100).

Recientemente se ha descrito que la GzmB de ratón podría inducir apoptosis al degradar a la proteína antiapoptótica Mcl1, liberándose así la proteína proapoptótica Bim, que colaborará a su vez en la activación de Bax y Bak (101, 102).

Se ha visto además, que esta proteasa puede inducir muerte celular al ser capaz de proteolizar directamente a la α -tubulina y a la filamina, provocando la desorganización del citoesqueleto (99, 103).

La GzmB también puede activar la vía apoptótica mitocondrial, provocando la caída del potencial de membrana. Se ha determinado que la GzmB puede proteolizar a la proteína proapoptótica Bid, generando Bid truncado (tBid), con posterior activación de Bak y Bax, liberación de citocromo c (cit c), formación del apoptosoma y activación de la caspasa-9 (89). También se ha visto que la GzmB induce la caída del potencial a través de una vía independiente de Bid, Bak y Bax, y dependiente de las caspasas-3 y 7 (89, 104).

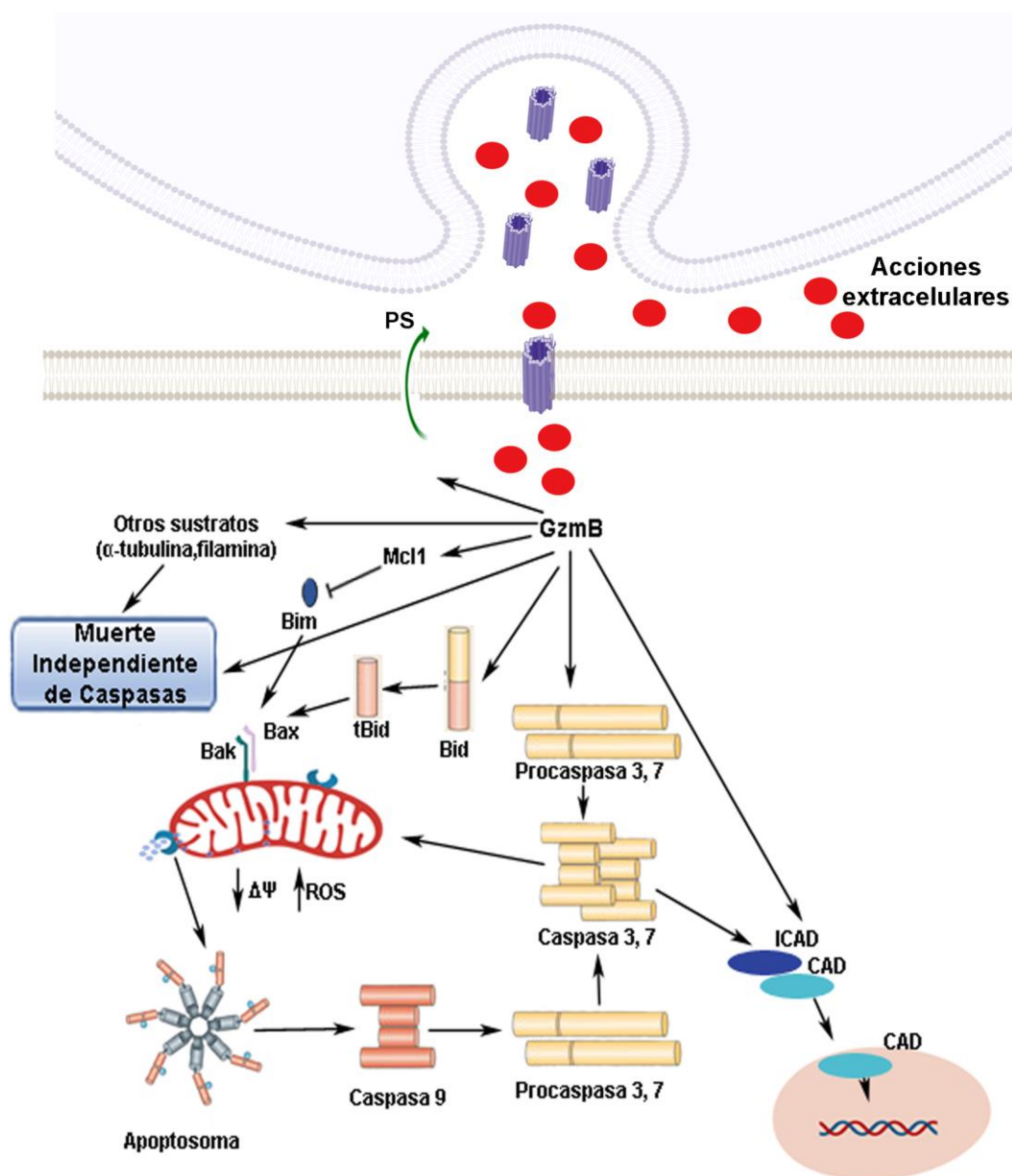


Figura 1.3 Apoptosis inducida por GzmB.

Otras funciones de la GzmB

La GzmB, además de funciones citotóxicas, se ha relacionado con procesos inflamatorios, el envejecimiento cutáneo, la cicatrización, las enfermedades cardiovasculares y también se le han atribuido funciones antivirales e inmunosupresoras (86).

Se ha visto que la GzmB puede degradar sustratos relacionados con la coagulación como el factor von Willebrand o el fibrinógeno (105). Además, la GzmB puede proteolizar a la decorina, fibronectina y vitronectina (80, 106), por

lo que se le ha implicado en procesos de reparación tisular. También se ha relacionado con enfermedades cardiovasculares como arterioesclerosis o aneurismas. Se piensa que la GzmB puede actuar sobre componentes de la matriz extracelular como la fibrilina-1, provocando inestabilidad de las paredes vasculares (80, 107, 108).

La GzmB también ha demostrado tener efectos antivirales directos. Además de su papel en la inducción de apoptosis en células infectadas, se ha visto que la GzmB, conjuntamente con la GzmH, puede inhibir la replicación de adenovirus y del virus del herpes simple, actuando sobre proteínas necesarias para la replicación (109, 110). Por otro lado, la GzmB puede ejercer efectos antivirales al proteolizar componentes celulares necesarios para replicación viral, transcripción, traducción, transporte intracelular y latencia viral (74).

Se han detectado niveles elevados de GzmB en suero de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide (111) y asma (66). También, se ha visto expresión incrementada de GzmB en basófilos de pacientes asmáticos (66, 73). Se ha demostrado que la GzmB es capaz de escindir a la citoquina IL-1 α , aumentando su actividad proinflamatoria *in vitro* (112), aunque aún no está claro si este proceso está involucrado en la regulación de las respuestas inflamatorias *in vivo*. Se han descrito papeles opuestos para la GzmB, favoreciendo tanto respuestas proinflamatorias (77, 113) como antiinflamatorias (114, 115), en modelos *in vivo* de enfermedades infecciosas e inflamatorias.

También se han descrito efectos inmunosupresores de la GzmB en cáncer (82). En los últimos años, se ha descubierto que diversos tipos celulares con funciones tumorigénicas expresan GzmB, por lo que esta proteasa podría contribuir a la progresión tumoral, inhibiendo la respuesta de las células inmunitarias contra el cáncer (82).

La GzmB expresada por las células Treg favorece la progresión tumoral en modelos de ratón (116). Hallazgos recientes indican que una alta proporción de células T CD8⁺/Treg es un marcador de pronóstico favorable para varios carcinomas sólidos y hematológicos. Por lo tanto, la GzmB puede tener roles

opuestos, en referencia al desarrollo tumoral, dependiendo de la fuente celular (linfocitos Tc/células NK o Treg) y la abundancia relativa de esas células en el microambiente tumoral (117-119).

Un subconjunto de linfocitos B humanos con funciones reguladoras (Bregs), también expresa GzmB (120), suprimiendo las respuestas antitumorales de las células T por un mecanismo no citotóxico que implica la escisión de la cadena ζ del receptor de células T (121). Estas células están presentes en el microambiente de diferentes tumores sólidos y tienen un papel potencial en la aparición y/o progresión de los tumores (122). De manera similar a lo que ocurre para las Treg, la abundancia relativa de linfocitos B citotóxicos GzmB⁺ frente a linfocitos Breg GzmB⁺ en el microambiente tumoral puede establecer el papel anti o protumoral de las células B que expresan GzmB.

Otros tipos celulares con funciones tumorigénicas también expresan GzmB, incluidas las células dendríticas plasmocitoides (pCDs) y las MDSCs. Las pCDs humanas que expresan GzmB bloquean la expansión de las células T *in vitro* (123, 124), sin embargo el papel protumorigénico de la GzmB expresada por las MDSCs humanas requiere un mayor estudio (125). Recientemente se ha descrito que las MDSCs aisladas de ratones de tipo salvaje portadores de tumores expresaban GzmB y Perf, y que eran capaces de promover mayor progresión tumoral, al compararlas con MDSCs aisladas de ratones deficientes en GzmB (126).

Los mastocitos, células importantes dentro del microambiente tumoral, también expresan GzmB en ausencia de Perf (65, 76). Se ha sugerido que este tipo de células también tiene dos roles opuestos en la progresión del cáncer (127). Por lo tanto, la GzmB de los mastocitos también puede regular negativamente las respuestas de las células T mediante mecanismos similares al de la GzmB de las células Breg. Algunos estudios sugieren que la GzmB derivada de mastocitos puede promover la permeabilidad vascular a través de la escisión de cadherinas y/o la liberación de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés “Vascular Endothelial Growth Factor”) (65, 77, 107).

Granzima A

La granzima A (GzmA) es la proteasa más abundante. Es expresada por varios grupos celulares. Presenta actividad triptasa y es secretada por las células citotóxicas en forma de homodímero (128).

Los ratones deficientes en GzmA carecen de defectos perceptibles en la citotoxicidad antitumoral (129). Sin embargo, se ha descrito que la GzmA, *in vitro*, es un mediador esencial en la citotoxicidad (72, 130). La capacidad citotóxica de la GzmA se demostró *in vitro* utilizando modelos heterólogos, observándose que, mientras que la GzmB necesitaba 4 h para inducir muerte celular, la muerte inducida por GzmA se producía a las 20 h, usando concentraciones micromolares (131, 132). Por el contrario, cuando se ensayó la GzmA en modelos autólogos (Perf, GzmA y células diana de la misma especie), no se observó que la proteasa indujera muerte celular, incluso a concentraciones micromolares, mientras que la GzmB inducía muerte celular a concentraciones nanomolares en las mismas líneas celulares (97, 133).

Como se ha mencionado anteriormente, la GzmA induce muerte celular *in vitro*, cuando se utiliza a concentraciones micromolares junto con Perf u otros agentes de liberación (72, 130, 133). La citotoxicidad mediada por GzmA se acompaña de la escisión de varios sustratos intracelulares, incluida la proteína del complejo mitocondrial I, NDUFS3 (del inglés, "NADH Dehydrogenase Fe-S protein 3"), generando caída del potencial mitocondrial y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés "Reactive Oxygen Species") (130, 134). El aumento del nivel de ROS activa los mecanismos de reparación celular, incluido el complejo SET asociado al retículo endoplasmático (135, 136). El complejo SET activado se transloca al núcleo, donde la GzmA escinde varios componentes de este complejo (Ape1, HMGB2 y SET) (135, 137, 138), lo que lleva a la liberación de la endonucleasa, NM23-H1, que induce daño monocatenario en el DNA, lo que produce muerte celular (72, 134, 139, 140). Además, la GzmA puede dejar al DNA más accesible a la acción de las nucleasas al proteolizar a la histona H1 (130, 141, 142) (Figura 1.4).

Se ha descrito que la GzmA de ratón es capaz de inducir una forma de muerte celular llamada atetosis. Esta se caracteriza por una cinética más lenta y

una morfología "similar a un gusano", totalmente diferente a la apoptosis o necrosis. La atetosis mediada por GzmA no requiere activación de caspasas, disrupción mitocondrial temprana, generación de ROS o pérdida de potencial de membrana mitocondrial, pero sí es imprescindible la correcta funcionalidad del citoesqueleto de actina (143).

Recientemente se han atribuido otras funciones biológicas a la GzmA durante una respuesta inmunitaria (Figura 1.4). Hace varios años se demostró que la GzmA purificada o las células citotóxicas que expresan GzmA, inducían la liberación de IL-1 β , TNF- α e IL-6 en monocitos humanos y macrófagos de ratón (133, 144). Otros estudios mostraron que la GzmA extracelular es capaz de inducir la producción de IL-6 e IL-8 en fibroblastos, e IL-8 en células epiteliales (145). La inhibición de la caspasa-1 reduce la secreción de IL-1 β y TNF- α inducida por hGzmA en los monocitos, lo que indica que la proteasa podría ser activadora del inflammasoma (133).

También se ha demostrado que la GzmA está elevada en pacientes con varios tipos diferentes de enfermedades infecciosas y trastornos inflamatorios crónicos, por ejemplo, en la artritis reumatoide (AR), (111, 146). Se ha descrito que la GzmA puede afectar al crecimiento intracelular de micobacterias en macrófagos humanos. En un estudio se demostró que la GzmA producida por células T $\gamma\delta$ humanas, o la GzmA recombinante, inhibían el crecimiento intracelular del patógeno, al inducir la producción de TNF- α en los macrófagos (147).

Esta proteasa también está incrementada durante la endotoxemia experimental y la sepsis bacteriana (148). Además, los ratones deficientes en GzmA fueron más resistentes al choque séptico inducido por LPS (133, 149). En nuestro grupo de investigación se demostró que la deficiencia en GzmA protege a los ratones contra la sepsis bacteriana *in vivo* sin comprometer el control del patógeno. Esta protección estuvo acompañada por una disminución de la producción de IL-1 α/β , TNF- α e IL-6 en ratones GzmA knock-out (KO) (150).

Por otro lado, los pacientes que sufren infecciones por el virus de Epstein-Barr, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y en pacientes con infecciones

demostró que el mRNA de GzmA estaba regulado positivamente en biopsias intestinales de pacientes con colitis ulcerativa (UC, del inglés “Ulcerative Colitis”) (155). Otro estudio, confirmó que la expresión de GzmA en subconjuntos específicos de células T CD4⁺ se correlacionaba con la eficacia a Etrolizumab, un anticuerpo monoclonal anti- $\beta 7$ integrina (156).

Por último, a la GzmA también se le ha atribuido la función de inducir proteólisis de la matriz extracelular (157-159), que produce diversos efectos biológicos, incluida la inducción de anoikis, un tipo de muerte celular desencadenada por el desprendimiento de la matriz extracelular (160). También podría favorecer la migración de las células citotóxicas a través de los tejidos (158). La remodelación de la ECM inducida por GzmA se ha convertido en un foco de interés porque pudiera influir en la angiogénesis y la metástasis tumoral (Figura 1.4).

Granzimas huérfanas

Existen muy pocos informes sobre las funciones biológicas de los restantes miembros de la familia de las Gzms, hasta ahora denominadas Gzms huérfanas (161). No existen datos que puntualicen las funciones biológicas de las GzmD, GzmE, GzmF y GzmG. Sin embargo, algunos estudios han explorado la biología y funciones de las Gzms C, H, K y M. En la tabla 1.4 se muestra un resumen de estas funciones.

Gzm	Actividad citotóxica	Actividad no citotóxica
GzmK	Induce muerte celular <i>in vitro</i> . No está claro si la GzmK expresada por los linfocitos Tc induce la muerte de las células diana (72, 162-164).	Inflamación en diferentes tipos celulares (165). Producción de IL-6, IL-8 y MCP-1 en fibroblastos pulmonares humanos, por un mecanismo dependiente PAR-1 (84, 166). Producción de IL-1 β en macrófagos peritoneales pre-estimulados con LPS (165). Incremento de los niveles plasmáticos de GzmK en pacientes con sepsis (167).
GzmM	Induce muerte celular (168) Desorganiza la red de microtúbulos al escindir α -	Niveles disminuidos de IL-1 α/β , TNF- α e IFN- γ , en ratones GzmM ^{-/-} , en comparación con

Gzm	Actividad citotóxica	Actividad no citotóxica
	<p>tubulina (169).</p> <p>Inactiva al inhibidor de GzmB, SerpinaB9, aumentando la susceptibilidad de las células diana a la apoptosis inducida por GzmB (170).</p> <p>Ratones GzmM^{-/-} muestran actividad citotóxica <i>in vitro</i> comparable a los ratones wt (171), lo que indica que la función principal de GzmM podría no estar relacionada con la muerte celular <i>in vivo</i>.</p>	<p>los ratones wt, tratados con LPS (149).</p> <p>Ratones GzmAxM^{-/-} son más resistentes a la endotoxemia inducida por LPS que los GzmM^{-/-} (149).</p> <p>GzmM, <i>in vitro</i>, no es capaz de cortar a la pro-IL-1β (149).</p> <p>Disminuye la producción de MIP-1α en células NK y macrófagos aislados del hígado de ratones GzmM^{-/-}, tratados con LPS o infectados con la bacteria Gram+ <i>Listeria monocytogenes</i> (172).</p> <p>Mayor supervivencia de ratones GzmM^{-/-} durante la infección con <i>Listeria monocytogenes</i>. (172).</p>
GzmH	Induce la muerte celular <i>in vitro</i> (72, 173).	Inactiva proteolíticamente a las proteínas adenovirales necesarias para la replicación viral (109, 174).
GzmC	<p>Induce, <i>in vitro</i>, muerte celular, con translocación de fosfatidilserina, condensación de cromatina y pérdida de potencial de membrana. No ocurre fragmentación del DNA, activación de caspasas, escisión de Bid o liberación de cit c (175).</p> <p>La expresión <i>in vivo</i> de la GzmC no se ha demostrado.</p>	No han sido descritas todavía.

Tabla 1.4 Funciones citotóxicas y no citotóxicas de algunas de las Gzms huérfanas.

1.2.2 Inhibidores de Gzms: Serpinas

Las Gzms están reguladas por una serie de inhibidores fisiológicos, dentro de los que destacan la superfamilia de inhibidores de serina proteasas, denominadas serpinas. Estas actúan formando complejos covalentes irreversibles con las proteasas, lo que resulta en su distorsión conformacional e inactivación (revisado en (176)). Se ha demostrado que los linfocitos citotóxicos sintetizan sus propias serpinas, que actúan en el citosol para neutralizar a las Gzms y protegerse de sus efectos (46). Recientemente se han descrito nuevas serpinas intracelulares, y es posible que los linfocitos Tc y las células NK se

protejan con serpinas específicas para cada una de las Gzms que expresan (177, 178).

El mecanismo inhibitor de las serpinas utiliza una región expuesta denominada bucle central reactivo (RCL, del inglés “Reactive Center Loop”) que se parece mucho al sitio de escisión del sustrato de la proteasa diana. La escisión del RCL inicia un cambio conformacional en el pliegue de la serpina que atrapa la proteasa en un complejo covalente 1:1 (176).

Se ha propuesto, aunque existen controversias, que en el entorno extracelular la GzmB es inhibida eficazmente por la proteína plasmática α 1-antitripsina, y en menor medida por α 2-macroglobulina (179-181). Un estudio más reciente demostró la presencia del inhibidor de la GzmB, SerpinaB9 o inhibidor-9 (PI-9), en plasma humano de pacientes sanos (182). La fuente de dicha SerpinaB9 circulante no está clara, ya que la misma es normalmente una proteína nucleocitoplasmática que carece de una secuencia de señal convencional para la secreción, y no se libera al medio en las células transfectadas (183, 184).

Hasta la fecha, no se han identificado inhibidores extracelulares de GzmB humana, y varios estudios demuestran que la GzmB mantiene su actividad en el plasma humano (70). Sin embargo en ratones, la actividad extracelular de la GzmB es inhibida por la Serpina3n (α 1-antiquimotripsina). Se ha confirmado que la Serpina3n reduce la tasa de ruptura aórtica y muerte en un modelo de ratón de aneurisma aórtico abdominal, inhibiendo la degradación de la decorina mediada por GzmB (185). Además, se ha demostrado que la administración tópica de Serpina3n acelera la reparación de tejidos y la cicatrización de heridas en un modelo de ratón con diabetes (78).

Se ha demostrado que la GzmM forma complejos estables con SerpinaB4, suprimiendo la muerte celular mediada por esta proteasa (177). Por otro lado, se ha identificado a la SerpinaB1 como inhibidor intracelular de GzmH humana, a través de un mecanismo suicida de cambio conformacional (178).

La GzmA puede ser inhibida por el inhibidor de proteasas α 2-macroglobulina. También, serpinas extracelulares como la antitrombina III (ATIII

o SerpinaC1), el inhibidor C1 y el inhibidor de tripsina secretora pancreática de tipo Kazal, han demostrado ser capaces de inhibir a esta proteasa (159, 186, 187). Además, la serpina extracelular SerpinE2 (PN-I o Nexin-1) inhibe parcialmente a la GzmA de ratón, formando complejos irreversibles estables en SDS (dodecilsulfato de sodio), con una o ambas subunidades de la proteasa homodimérica (188-190). La inhibición es mayor en presencia de heparina (188).

Recientemente se ha identificado a la Serpinab6b como un inhibidor rápido y eficiente de la mGzmA, pero no de la hGzmA (191). Serpinab6b se identificó originalmente en células NK (192), y es una proteína nucleocitoplasmática que protege, *in vitro*, contra la muerte inducida por mGzmA.

En este mismo estudio se indicó que para una inhibición eficiente de mGzmA por Serpinab6b, era necesaria tanto la interacción en el exosito, como una secuencia RCL favorable. La Serpinab6b no puede inhibir a la mGzmA monomérica, en la que se pierde la interacción en el exosito. La incapacidad de la Serpinab6b para inhibir hGzmA es curiosa ya que la presentación en fagos sugiere que el RCL debería ser escindido por hGzmA, y la interacción con el exosito también debería estar presente (191).

Estudios anteriores han identificado inhibidores de hGzmA en plasma humano. La SerpinaC1 inhibe la hGzmA en plasma, de manera similar a la inhibición observada para Serpinab6b y mGzmA (186). También se demostró que el SerpinaC1 de ratón, *in vivo*, inhibía a mGzmA. De estos datos se deduce que la hGzmA tiene un inhibidor extracelular eficiente y ningún inhibidor intracelular, mientras que mGzmA tiene inhibidores tanto extracelulares como intracelulares, lo que respalda la posible diferencia en las funciones de mGzmA en relación con hGzmA.

1.3 Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica, inflamatoria, autoinmune y de etiología desconocida. Aproximadamente el 1 % de la población mundial la padece (193). Afecta principalmente a la cavidad sinovial de las articulaciones. Se caracteriza por inflamación crónica e hiperplasia sinovial, que lleva a la destrucción de cartílagos y huesos (193). Además, la inflamación sistémica correspondiente puede dar lugar a trastornos de múltiples sistemas de órganos (193, 194).

Pasados 10 años del inicio de la enfermedad, más del 50 % de los enfermos sufre discapacidad grave (Blumberg y Fox 2001), reduciéndose en muchas ocasiones la esperanza de vida de estos pacientes (195). Se ha visto que la mortalidad en pacientes con AR es 60-70 % más alta en comparación con la población general, una diferencia en supervivencia que parece estar aumentando (194).

Otro aspecto muy importante es la gran carga económica asociada con la progresión de la enfermedad (196). Un estudio que siguió a pacientes con AR desde las etapas iniciales del diagnóstico, encontró una prevalencia del 39 % de discapacidad laboral después de 10 años (197). Además de los enormes costes indirectos, cada vez son mayores los recursos que se destinan a la atención médica de pacientes con AR (198). Los estudios más recientes demuestran que estos datos no han mejorado en los últimos años (199).

1.3.1 Epidemiología

La prevalencia mundial general de la AR es aproximadamente del 0,5 % al 1 % en la población caucásica, pero varía entre 0,1 % (en africanos rurales) y 5 % (en poblaciones de nativos americanos) (194). En 2005, se estimó que la AR afectaba a 1,3 millones de adultos en los Estados Unidos, lo que representa el 0,6 % de la población (200). En 2007, se estimó que 1,5 millones de adultos tenían AR (201). En España, la enfermedad tiene una prevalencia del 0,5 % y una incidencia de 0,08 a 0,20 casos/1000 personas al año (202).

Las mujeres tienen dos o tres veces más probabilidades de verse afectadas que los hombres. Una de cada 12 mujeres y 1 de cada 20 hombres desarrollarán una enfermedad reumática autoinmune inflamatoria durante su vida (194).

1.3.2 Etiología

La etiología de la AR no se conoce por completo y se supone que se ve afectada por causas ambientales, predisposición genética y sexo. La hipótesis principal es que la AR es el resultado de una exposición ambiental o "desencadenante" en un individuo genéticamente susceptible (194, 203).

Los factores de riesgo ambientales propuestos incluyen: género, tabaquismo, exposición a sílice, agentes infecciosos, deficiencia de vitamina D, obesidad y cambios en la microbiota, aunque los estudios para algunos de estos factores no son muy sólidos (194, 204).

1.3.2.1 Factores genéticos

Estudios llevados a cabo en hermanos gemelos han estimado que la heredabilidad de la AR es de aproximadamente un 60 % (193).

Diversos estudios han demostrado una fuerte correlación entre la presencia de AR y algunos alelos del antígeno leucocitario humano (HLA)-DR. Los alelos HLA-DRB1*01 y HLA-DRB1*04 (que codifican para la molécula DR4) son los más comúnmente encontrados en AR y su presencia se asocia con una enfermedad más severa y con alta mortalidad (205).

Los mecanismos epigenéticos, incluidos la metilación del DNA y la acetilación de histonas, podrían tener un papel importante en el desarrollo de la AR. La metilación del DNA proporciona un mecanismo a través del cual los factores ambientales pueden inducir cambios en la actividad celular. Por ejemplo, en pacientes con AR positivos para anticuerpos antiproteínas citrulinadas (ACPAs, del inglés "Anti-Citrullinated Protein Antibody"), que además eran fumadores, se encontraron niveles de metilación más elevados cuando portaban el alelo de riesgo HLA-DRB1, en comparación con los que no lo portaban (194, 206).

1.3.3 Sistema inmunitario y artritis reumatoide

1.3.3.1 Autoanticuerpos en la patogenia de la AR

Una característica destacada de la AR es la presencia de varios tipos de autoanticuerpos dirigidos hacia numerosos antígenos. La mayoría de esos anticuerpos no son específicos para AR (207). Los mismos contribuyen a la patología de la AR uniéndose directamente a sus antígenos, induciendo la formación de complejos inmunes, la activación del complemento y de receptores Fc, la producción de factores quimiotácticos y el reclutamiento de células polimorfonucleares. Estas participan en la reacción inflamatoria mediante la producción de proteasas que ocasionan daño tisular (208, 209).

El autoanticuerpo más conocido es el factor reumatoideo (FR). Este biomarcador, fue incluido en los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (CAR) (1987) (210, 211). El FR es una inmunoglobulina (IgM) dirigida contra la porción Fc de la IgG (211, 212). Es importante tener en cuenta que no en todos los casos de AR se expresa el FR, sin embargo, aquellos con FR positivo tienden a manifestarse con erosión ósea y peor pronóstico (213). El FR posee una gran sensibilidad para el diagnóstico de AR (de un 65 % a 85 %), el problema es su baja especificidad (50 % a 80 %), ya que puede detectarse en otros trastornos inflamatorios agudos y crónicos de tipo autoinmune o infeccioso, e incluso en poblaciones sanas, principalmente en mayores de 55 años (211).

La citrulinación es una modificación post-traducciona que ocurre en los residuos de arginina contenidos en proteínas y péptidos. Este es un proceso normal, requerido en varias funciones fisiológicas. La peptidil arginina desaminasa tipo IV (PAD4), es la enzima responsable de la citrulinación post-traducciona de los residuos de arginina (193, 214).

En la citrulinación ocurren procesos físico-químicos, que conducen a cambios en la masa molecular del péptido y llevan a la pérdida de la carga positiva de la arginina, adquiriendo la carga neutra de la citrulina. Esta nueva estructura del péptido es reconocida por el sistema inmunitario cuando es presentada por moléculas del HLA de clase II (215). Los residuos arginina citrulinados, con carga neutra, se unen con más eficacia a las moléculas HLA-

DR4. De esta forma se lleva a cabo la presentación de antígeno a las células T, que a su vez estimulan a las células B para sintetizar una gama de anticuerpos que reconocen autoproteínas, las proteínas citrulinadas (216, 217).

Se han descrito distintas proteínas citrulinadas incluidas proteínas intracelulares (como las histonas) y proteínas de la matriz (fibronectina, colágeno, fibrinógeno, enolasa y vimentina) (218). La microbiota también puede inducir la citrulinación. Por ejemplo, *P. gingivalis*, común en la enfermedad periodontal, expresa la enzima peptidil arginina deiminasa (PAD) y puede inducir la citrulinación y, por lo tanto, promover la generación de ACPAs (219). Los ACPAs poseen una especificidad del 98 % y una sensibilidad del 80 % (220) y pueden detectarse hasta 15 años antes del inicio de los síntomas clínicos de AR. Esto indica una fase preclínica de la enfermedad en la que la activación inmunológica ya está en curso, lo que les confiere un alto valor predictivo (212).

Otros anticuerpos también se han asociado con la AR. Por ejemplo, los anticuerpos contra antígenos carbamilados, también denominados anti-CarP (221), así como, el anticuerpo contra queratina K8 o anti-K8 (222), el anticuerpo anti-p68 y anti-Sa (223). Otros anticuerpos asociados con AR son anti-RA33, anti-calpastatina, anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA), anticuerpos contra antígenos nucleares (ANA), anti-colágeno tipo II, anti-fibronectina y anti-GPI (Glucosa 6-Fosfato Isomerasa) (224). La mayoría de estos autoanticuerpos no son específicos de la AR, ya que también se encuentran fácilmente en otras enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES) y la osteoartritis (223).

1.3.3.2 Fisiopatología de la AR

Una articulación sana está compuesta por dos extremos óseos adyacentes cubiertos por una capa de cartílago (Figura 1.5 izquierda). El espacio entre los extremos se llama cavidad articular, la cual está delimitada por la membrana sinovial en ambos lados y contiene líquido sinovial. Por el contrario, en la AR (Figura 1.5 derecha), la membrana sinovial se vuelve hiperplásica e infiltrada por los leucocitos, causando inflamación crónica de la sinovial (sinovitis reumatoide), lo que causa desgaste en el cartílago y erosión ósea.

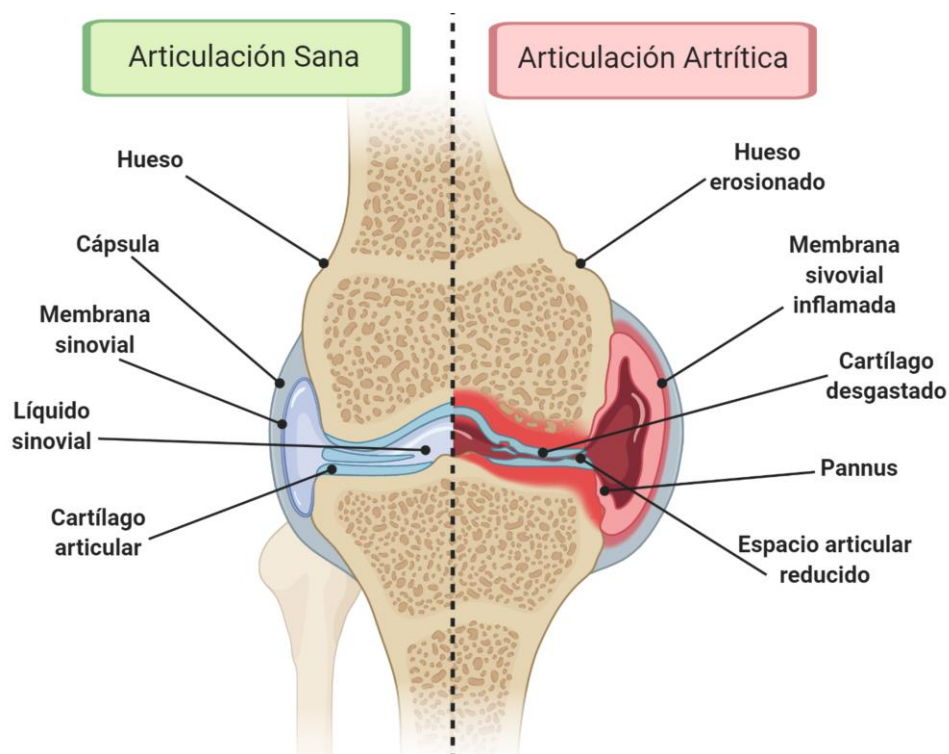


Figura 1.5 Cambios articulares en la artritis reumatoide. Izquierda: articulación sana. Derecha: articulación artrítica.

La confluencia de la susceptibilidad genética y los factores ambientales determinan el desarrollo de una respuesta autoinmune que precede a la artritis clínica. Las modificaciones post-traduccionales, como la citrulinación (o carbamilación), pueden generar neoepítopos que el sistema inmunitario adaptativo es capaz de reconocer (193, 225, 226). Estos péptidos alterados son presentados por las APCs, activando así una respuesta inmunitaria adaptativa, lo que provoca la formación de autoanticuerpos. Las células B secretan estos autoanticuerpos, como por ejemplo ACPAs, además de citoquinas proinflamatorias que potencian la AR. La función principal de las células T es activar macrófagos y fibroblastos y transformarlos en células destructoras del tejido óseo. El infiltrado sinovial incluye células del sistema inmunitario innato y adaptativo (226) y crea un microambiente donde los sinoviocitos similares a fibroblastos (FLS, del inglés “Fibroblast Like Synoviocytes”) y los macrófagos adquieren un fenotipo invasivo e inflamatorio, lo que conduce a la hiperplasia del revestimiento sinovial (227, 228). Los FLS, además de citoquinas, secretan

metaloproteasas (MMPs, del inglés “Matrix Metalloproteinases”) y colagenasa, promoviendo la destrucción del cartílago (226, 229). La infiltración de leucocitos y la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α o RANKL (Ligando del Receptor Activador para el Factor Nuclear κ B) favorecen, directa e indirectamente, la maduración de pre-osteoclastos a osteoclastos, lo que conduce a la erosión ósea (226). Las citoquinas y los factores de crecimiento liberados por las células infiltradas, junto con la hipoxia resultante de la hiperplasia sinovial, desencadenan la angiogénesis (226, 230), estableciendo un circuito de retroalimentación que favorece la infiltración constante de leucocitos y la inflamación crónica (Figura 1.6).

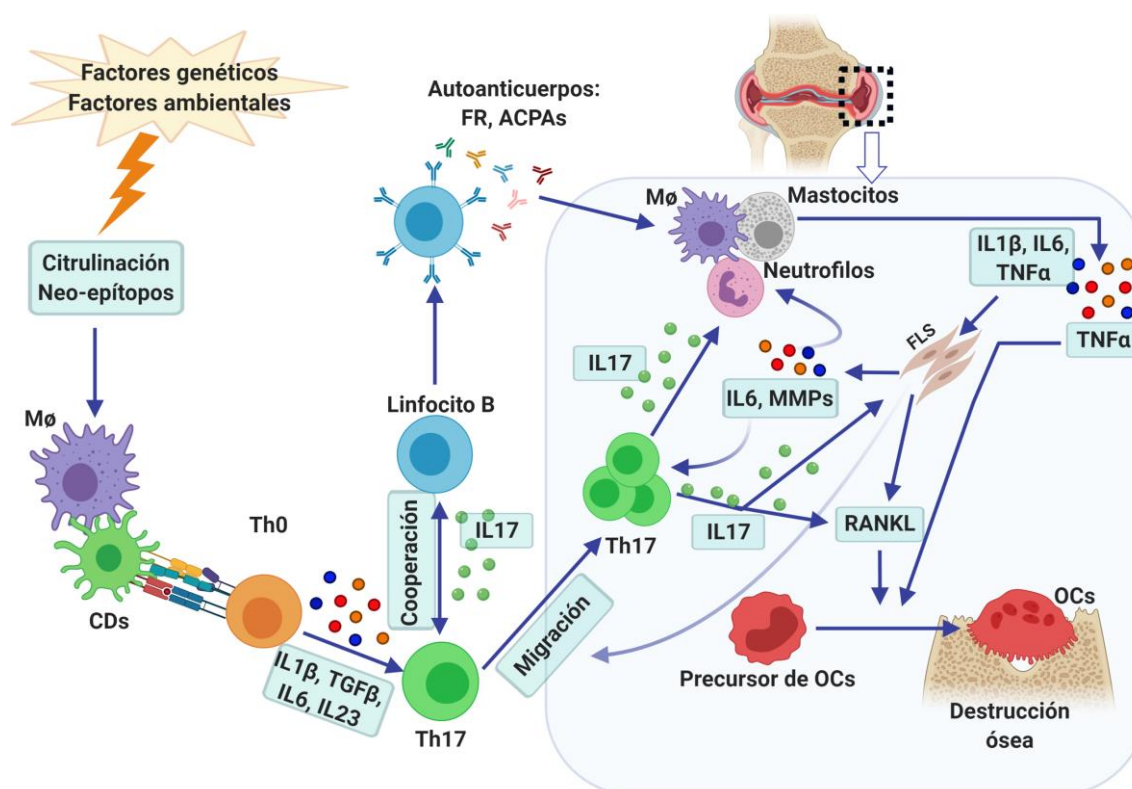


Figura 1.6 Fisiopatología de la AR. Adaptado de (231).

1.3.3.3 Papel patogénico de las células del sistema inmunitario en la AR

Como se ha mencionado anteriormente, en la patogénesis de la AR, como trastorno autoinmune, participan una gran variedad de diferentes poblaciones de

células inmunitarias, incluidos los linfocitos B y T, los macrófagos, además de los FLS y los osteoclastos.

Linfocitos B

Las células B, en el caso de la AR, funcionan como uno de los factores subyacentes del inicio de la AR (232). Las células B autorreactivas identifican los antígenos del huésped, desencadenando la destrucción de células o tejidos (232). En individuos sanos las células B autorreactivas se eliminan a través de procesos que están muy regulados por la tolerancia central y periférica (233).

En pacientes con AR, ambos puntos de control son generalmente defectuosos, lo que lleva a la gran producción de células B maduras autorreactivas. Se ha demostrado, que los pacientes con AR no tratados, muestran un aumento de células B autorreactivas en la sangre periférica 3,4 veces superior en comparación con los pacientes sin AR (234). Tal defecto puede ser causado por una mutación en el gen PTPN22 que interrumpe la vía de señalización de BCR en el punto de control central de tolerancia de células B (235). Por otra parte, la mayor frecuencia de células B polirreactivas y autorreactivas en pacientes con AR, evidencian el deterioro de la tolerancia periférica (234). La disfunción de la tolerancia periférica propicia el aumento de la supervivencia y resistencia a la apoptosis de las células B (236).

Las células B autorreactivas también pueden actuar como APCs para estimular la maduración y diferenciación de las células T en células T CD4⁺ de memoria (237). También se ha encontrado que la síntesis local de citoquinas como TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23 e IL-1, inducida por células B autorreactivas, actúa sobre otras células con relevancia patológica en la AR, lo que conduce a la disfunción inmune, inflamación y daño óseo (238).

Un estudio demostró que la producción de RANKL está elevada en las células B de memoria de sangre periférica, el líquido sinovial y tejidos de pacientes con AR, en comparación con individuos sanos (239, 240). El mismo estudio también sugirió que las células B que expresan RANKL estaban altamente asociadas con la diferenciación de OCs (239).

Linfocitos T CD4⁺

Las células T CD4⁺ son los linfocitos más abundantes en el infiltrado sinovial (241), donde regulan otros tipos de células y desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria patológica que conduce al daño articular.

Existen evidencias convincentes que respaldan que las células T CD4⁺ contribuyen significativamente a la respuesta autoinmune crónica durante la AR (242). Se pensaba que las células Th1, productoras de citoquinas proinflamatorias, eran las células principales en la patogénesis de la AR. El descubrimiento del papel de otros subtipos de células T CD4⁺ durante la AR, como las células Th2, Th17 y Treg, ha dejado claro que la patogénesis de la enfermedad es mucho más compleja.

Durante su activación, las células T CD4⁺ interactúan con HLA de clase II, así como con moléculas coestimuladoras como CD28, que se expresan en la superficie de las APCs (243). El papel de las células T CD4⁺ en la inflamación crónica durante la AR también está respaldado por su asociación con los alelos MHC-II específicos, como el HLA-DR4. Como se mencionó anteriormente, esta interacción conduce a una forma más agresiva de AR (244).

Las evidencias sugieren que las células T CD4⁺ (Th) contribuyen a la patogénesis de la AR principalmente a través de la secreción de citoquinas y quimioquinas (Figura 1.7) (242).

Las células T CD4⁺ tipo 1 (Th1) están altamente activadas en la AR y secretan IFN- γ , IL-2 y TNF- α (242). Además, las células Th1 activan a los macrófagos para que actúen como APCs (244).

Otro tipo de células T CD4⁺ son las de tipo 2 (Th2). Este grupo celular produce IL-4 e IL-5, citoquinas que juegan un papel central en la activación de células B y en el cambio de isotipo de inmunoglobulinas (Igs) a IgE (245).

Por otra parte, las células Th17 contribuyen al desarrollo de AR en cada una de las fases de la enfermedad, es decir, en la iniciación, inflamación y destrucción ósea. Las células Th17 producen principalmente IL-17, que estimula la producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y MMPs (246). Además, estimulan a los linfocitos B para que produzcan autoanticuerpos, y activan a los FLS para que produzcan citoquinas y MMPs (247, 248).

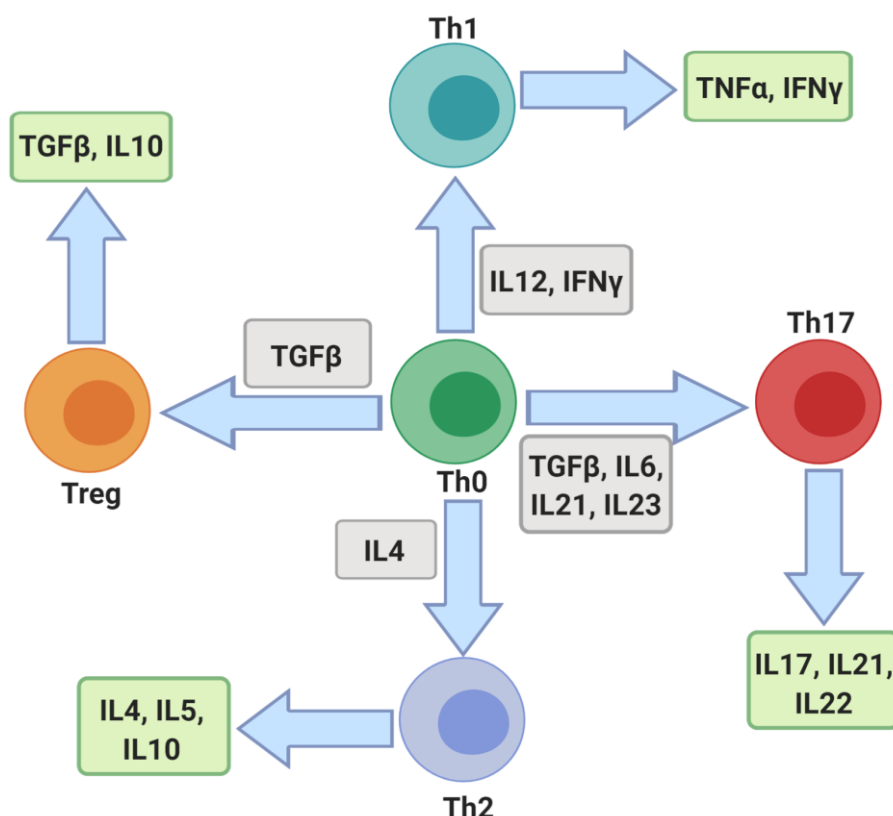


Figura 1.7 Células T CD4+ en la patogénesis de la AR. Adaptado de (249).

Se ha detectado un mayor número de células Th17 y un incremento en los niveles de expresión de IL-17 en el suero de pacientes con AR en comparación con individuos sanos (250). Algunos estudios han mostrado que tanto la IL-17 sérica como las células Th17 circulantes se correlacionan con la puntuación de actividad de la enfermedad en 28 articulaciones (DAS28, del inglés “Disease Activity Score 28-joint counts”) (251), así como con marcadores comunes de la AR, como la proteína C reactiva (PCR) y la tasa de sedimentación eritrocitaria (TSE) (251, 252). Varios estudios han demostrado que IL-17 contribuye al crecimiento del pannus, la osteoclastogénesis y neoangiogénesis sinovial (253).

Además de las Th17, los macrófagos, los mastocitos y las células $\gamma\delta$ del infiltrado sinovial, también producen IL-17 (254).

Por otro lado, las células Treg $CD4^+CD25^+$, previenen la autoinmunidad al suprimir los linfocitos autorreactivos, a través de la producción de IL-10 y TGF- β (255). Sin embargo, las células Treg solo actúan en la supresión de la proliferación de células T efectoras, pero no inhiben la secreción de citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α o IL-6, producidas a partir de monocitos y células T activadas (256). Se han detectado células Treg en sangre y líquido sinovial de pacientes con AR (257). Sin embargo, el porcentaje de células Treg en pacientes con AR en comparación con individuos sanos es muy controvertido. Del mismo modo, se han observado resultados contradictorios en pacientes con AR cuando el porcentaje de células Treg se correlacionó con múltiples características clínicas como DAS28, edad, sexo, TSE, PCR, FR y duración de la enfermedad (257).

Las células T también desempeñan un papel fundamental en la estimulación de las células B y la producción de autoanticuerpos, lo que en consecuencia, contribuye a la patogénesis de la AR (258). Las células T auxiliares foliculares (Tfh) son la población dominante de células T que interactúa con los linfocitos B, generalmente dentro de los folículos de los órganos linfoides secundarios (SLOs, del inglés "Secondary Lymphoid Organs") y los tejidos periféricos inflamados (258). En general, las Tfh tienen como características fundamentales la expresión del receptor inducible y coestimulador de linfocitos T (ICOS), el receptor de quimioquina 5 (CXCR5), el receptor de inhibición de respuesta de muerte celular programada 1 (PD-1), y el factor de transcripción Bcl-6 (258, 259). Los linfocitos Tfh proporcionan señales de ayuda a los linfocitos B del folículo vía CD40L, y las citoquinas IL-21, IL-4 e IL-10 (260). Existe otro tipo de células T auxiliares de células B en la membrana sinovial durante AR, conocidas como células T auxiliares periféricas (Tph), que no expresan CXCR5 y solo expresan moderadamente Bcl-6. Las células Tph $CXCR5^-PD-1^{hi}$, una vez activadas, secretan CXCL13 para reclutar células B y producen IL-21, lo que propicia la supervivencia, proliferación y maduración de las células B (258-260).

Macrófagos

Los macrófagos son fundamentales en la fisiopatología de la AR (261, 262). Son muy abundantes en la membrana sinovial inflamada y en la unión cartílagopannus. Se ha demostrado correlación entre la progresión radiológica de la destrucción articular y el grado de infiltración de macrófagos sinoviales (263). Además, existe relación entre la eficacia terapéutica de la terapia antirreumática convencional con la regulación negativa de las funciones del sistema de fagocitos mononucleares (264, 265). También, se ha demostrado la eficacia de las terapias biológicas dirigidas contra las citoquinas producidas predominantemente por macrófagos (266, 267).

En una articulación inflamada, los macrófagos secretan TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IL-8 y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, del inglés “Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor”) (226). Además, están involucrados en la liberación de enzimas de degradación de la matriz, en la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés “Reactive Nitrogen Species”), también en procesos de fagocitosis y presentación de antígeno (193), todo lo que conduce a la destrucción articular (193, 226, 261). Este patrón de expresión de citoquinas proinflamatorias y óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS, del inglés “Inducible Nitric Oxide Synthase”) sugiere un fenotipo predominante de macrófagos M1. Además, los macrófagos también median múltiples procesos biológicos relacionados con la AR, como el reclutamiento de linfocitos, angiogénesis y proliferación de FLS (193, 226, 261). Similar a las células B, los macrófagos actúan como APCs y se ha demostrado que expresan HLA-DR y moléculas de adhesión de leucocitos, lo que permite a los macrófagos participar en la activación de las células T junto con las células B (238). La activación de células T mediada por macrófagos da como resultado la producción de células T efectoras, que a su vez expresan mediadores proinflamatorios como IL-1 α , IL-1 β y MMPs, que incrementan la patogénesis de la AR (268).

Sinoviocitos tipo fibroblasto

Los FLS son un componente importante de la arquitectura de la articulación. En una articulación sana, los FLS forman el revestimiento sinovial y

producen líquido sinovial. Los FLS adquieren un fenotipo invasivo en la AR, causando hiperplasia del revestimiento sinovial. Esta hiperplasia origina un ambiente hipóxico, por lo que se propicia la angiogénesis, favoreciendo la perpetuación de la inflamación. Además, en AR, los FLS secretan grandes cantidades de proteasas y citoquinas proinflamatorias, que desencadenan la destrucción del cartílago (226-229).

La síntesis de MMPs por FLS (particularmente MMP-1, 3, 8, 13, 14 y 16) promueve el desensamblaje de la red de colágeno tipo II, un proceso que altera el contenido de glicosaminoglicanos y la retención de agua y conduce directamente a la disfunción biomecánica. La MMP-14 parece ser la MMP predominante expresada por FLS para degradar la matriz de colágeno del cartílago (226, 269).

Las células T CD4⁺, activadas en presencia de autoantígeno, afectan a la función de los FLS mediante la interacción directa célula-célula. Por ejemplo, las células T CD4⁺ inducen la producción de IL-15, TNF- α e IL-18 por FLS (247). También se ha demostrado que la acción de las células T CD4⁺ activadas, propicia la disminución de la síntesis de colágeno por FLS, un proceso mediado, al menos en parte, por IFN- γ , TNF- α e IL-1 α (226, 248).

Osteoclastos

La homeostasis ósea depende del equilibrio entre la actividad de resorción continua de los OCs y la formación de huesos por los osteoblastos (Figura 1.8) (270). El hallazgo patológico de un mayor número de OCs en la sinovial de las articulaciones durante la AR (271), sugirió que estas células podrían tener un papel trascendental en la resorción ósea durante la enfermedad. Los OCs pueden producir proteasas, incluida la cathepsina K (272), en un microambiente local acidificado, y así degradar la matriz ósea mineralizada. La destrucción de estos tejidos da lugar a fosas de resorción profundas, que se llenan de tejido inflamatorio (273).

Las citoquinas sinoviales, particularmente M-CSF (del inglés, “Macrophage Colony-Stimulating Factor”) y RANKL, promueven la diferenciación de osteoclastos e invasión del periostio adyacente al cartílago articular (274).

Estudios recientes indican que los osteocitos expresan una mayor cantidad de RANKL que los osteoblastos y, por lo tanto, son la principal fuente de RANKL en la remodelación ósea *in vivo* (275, 276). El $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-17 y otras citoquinas, incrementan la diferenciación y activación de OCs (277). Se ha demostrado que la inhibición clínica de $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 y RANKL retrasa la erosión ósea en AR. En particular, el bloqueo de RANKL actúa solo sobre el hueso, sin ningún efecto sobre la inflamación o la degradación del cartílago (278).

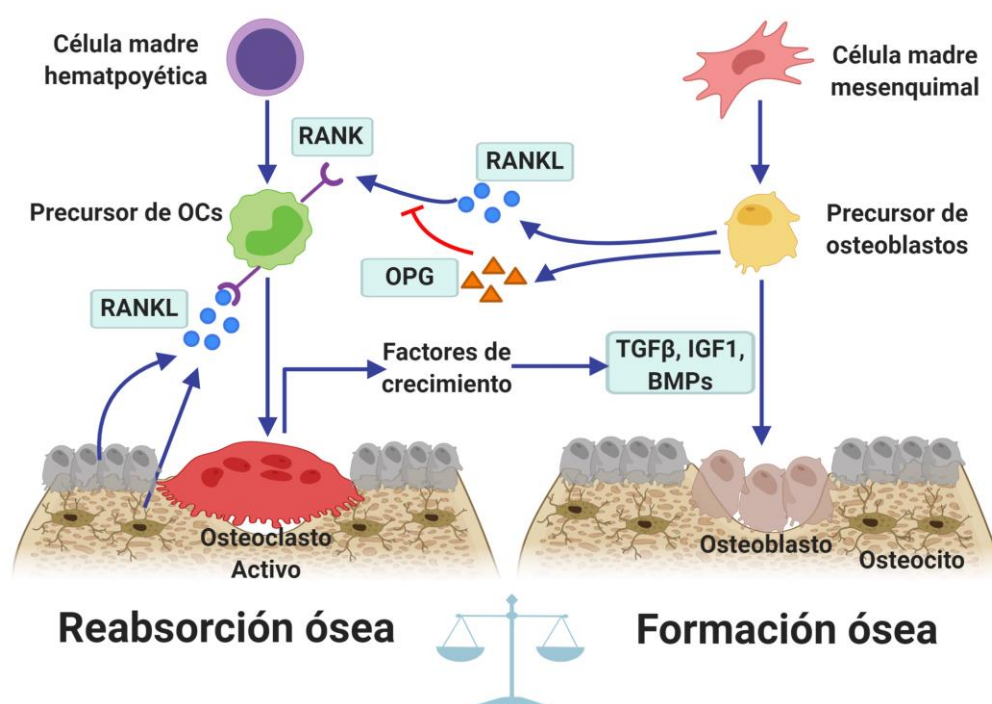


Figura 1.8 Remodelación ósea. IGF: factor de crecimiento insulínico 1 (del inglés, "Insulin Growth Factor 1"). BMPs: proteínas morfogenéticas del hueso (del inglés, "Bone Morphogenetic Proteins"). OPG: osteoprotegerina.

Las células precursoras de OCs expresan receptores para las citoquinas proinflamatorias, lo que potencia la inflamación y también promueve osteoclastogénesis al aumentar la señalización RANK-RANKL. Es importante destacar que $\text{TNF-}\alpha$ y $\text{TGF-}\beta$ inducen osteoclastogénesis incluso en ausencia de RANK (279).

En la tabla 1.5 se resumen las funciones de las células anteriormente mencionadas, así como de otras células del sistema inmunitario con relevancia en la AR.

Tipo celular	Subtipo	Papel en la patogénesis de la AR
Linfocitos-B	-	Producen anticuerpos y citoquinas. Actúan como APCs. Activan células T.
Linfocitos-T	Th1	Producen citoquinas (IFN- γ , IL-2 y TNF- α). Activan macrófagos.
	Th2	Producen citoquinas (IL-4, IL-5). Activan células B. Promueven cambio de isotipo a IgE.
	Th17	Producen citoquinas (fundamentalmente IL-17). Estimulan la síntesis de MMPs. Estimulan producción de autoanticuerpos. Activan a los FLS. Promueven crecimiento del pannus, neoangiogénesis y osteoclastogénesis.
	Treg	Suprimen linfocitos autorreactivos. Producen IL-10 y TGF- β .
	Tfh Tph	Supervivencia, proliferación y maduración de las células B.
Linfocitos-T $\gamma\delta$	T $\gamma\delta$ 17	Producen citoquinas (fundamentalmente IL-17). Favorece a la presentación antigénica. Activa a las células T $\alpha\beta$.
Macrófagos	-	Actúan como APCs. Activan células T. Producen citoquinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IL-8, GM-CSF). Promueven la angiogénesis y la proliferación de FLS.
Fibroblastos (FLS)	-	Hiperplasia del revestimiento sinovial. Propician ambiente hipóxico y angiogénesis. Secretan MMPs (MMP-1, 3, 8, 13, 14 y 16). Producen citoquinas proinflamatorias (IL-15, TNF- α e IL-18).
Osteoclastos	-	Producen proteasas (ejemplo catepsina K), favoreciendo la resorción ósea.
Mastocitos	-	Producen citoquinas proinflamatorias.
DCs	-	APCs. Activan células T.
Células NK	-	Producen citoquinas proinflamatorias (IFN- γ).

Tabla 1.5 Células del sistema inmunitario y su papel en la patogénesis de la AR.

1.3.3.4 Citoquinas en AR

Como ya se ha mencionado, en la AR varios tipos celulares producen niveles elevados de las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y TNF- α . Estas

citoquinas a su vez, ejercen sus efectos de manera directa e indirecta, propiciando la producción de citoquinas y quimioquinas adicionales, así como de enzimas que degradan la matriz, lo que resulta en una "tormenta" de citoquinas en la membrana sinovial inflamada. En la tabla 1.6 se muestra la contribución de las principales citoquinas implicadas en la patogenia de la AR.

Se ha demostrado que TNF- α e IL-6 desempeñan papeles esenciales en la patogénesis de la AR (280). El TNF- α estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B, linfocitos T y células NK, así como la producción de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y de otros mediadores que causan la destrucción del tejido (249). TNF- α también promueve la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y suprime las células Tregs. Además, estimula la angiogénesis y la sensación de dolor (280, 281). La IL-6 promueve la activación local de leucocitos y la producción de autoanticuerpos y es responsable de las respuestas de fase aguda que incluyen anemia, disfunción cognitiva y desregulación del metabolismo lipídico (280, 282). Tanto TNF- α como IL-6, así como RANKL, amplifican la activación y diferenciación de osteoclastos (193).

Las citoquinas IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23 contribuyen a la erosión ósea debido a la inflamación sinovial (249). La expresión de IL-17 aumenta en el tejido sinovial de pacientes con AR (250), correlacionándose sus niveles con la actividad de la enfermedad (251), por lo que desempeña un papel esencial en la patología reumatoide (252). Se ha demostrado que la IL-17 estimula la producción de MMP1 y MMP3, TNF- α , IL-6, IL-8 y otras citoquinas proinflamatorias, aumentando así la infiltración de células inmunitarias en la membrana sinovial (249). IL-17 estimula la osteoclastogénesis, induciendo la producción de RANKL por los FLS y de manera indirecta al actuar sobre las células precursoras de osteoclastos (283). Las citoquinas IL-21 e IL-22, estimulan la osteoclastogénesis principalmente favoreciendo la sobreexpresión de RANKL en fibroblastos sinoviales (284, 285). Por su parte, la IL-23 induce la expansión de células Th17 (286). Se han encontrado cantidades elevadas de IL-23 en pacientes con AR (287), niveles estos que se han correlacionado con la actividad de la artritis temprana (288).

Citoquina	Células que la producen	Efectos en AR	Terapias disponibles y en estudio
TNF-α	MØ, DCs, células Th1 y células NK	Activación de leucocitos, células endoteliales, FLS y osteoclastos Producción de citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión y MMPs Supresión de la función de células Treg.	Infliximab Etanercept Adalimumab Certolizumab Golimumab
IL-6	MØ, DCs y Sinoviocitos	Activación de leucocitos y osteoclastos Diferenciación de linfocitos B Regulación del metabolismo lipídico y la respuesta de fase aguda	Tocilizumab (se une al receptor celular de la IL-6)
IL-17	Linfocitos T CD4 ⁺ Th17, células T $\gamma\delta$ y Mas	Activación de FLS y condrocitos Osteoclastogénesis Producción de citoquinas, quimioquinas y MMPs. Reclutamiento de neutrófilos	Secukinumab (Estudio de fase III completado) Ixekizumab (Estudio de fase II completado)
IL-1α IL-1β	MØ, Mas y Sinoviocitos	Activación de leucocitos, células endoteliales, FLS y osteoclastos Producción de MMPs	Anakinra (anti-IL-1 β)
IL-21 IL-22	Linfocitos T CD4 ⁺ Th17 y células NK	Osteoclastogénesis Activación de células Th17 y linfocitos B	NNC114-0005 (anti-IL-21, estudio de fase I completado)
IL-23	MØ, DCs	Expansión de células Th17	-
RANKL	Sinoviocitos, Osteoblastos y Linfocitos T CD4 ⁺ Th17, FLS	Maduración y activación de osteoclastos.	Denosumab (varios ensayo clínicos completados y en curso)
IFN-γ	Linfocitos T CD4 ⁺ Th1 y células NK	Presentación antigénica Activación de macrófagos Producción de quimioquinas.	-

Tabla 1.6 Citoquinas implicadas en la patogenia de la artritis reumatoide.

1.3.4 Modelos murinos para el estudio de AR

Los modelos animales para el estudio de AR proporcionan herramientas importantes para entender los diversos mecanismos celulares y moleculares que conducen a la AR. Comúnmente se usan ratas y ratones para estudiar la progresión y la patogénesis de la AR. Los modelos de roedores se utilizan ampliamente debido al bajo costo, la homogeneidad del fondo genético y la facilidad de manejo. Otro beneficio del uso de modelos animales, especialmente

ratones, para el estudio de AR, es la posibilidad de modificar selectivamente el genoma de estos y generar cepas knockout para genes específicos (289).

Las características clínicas de la artritis inducida en muchos modelos de ratones se parecen a las de la AR humana. Se ha demostrado que diversas manipulaciones, tanto genéticas como ambientales, producen AR en ratones. Además, varios agentes pueden inducir la enfermedad en cepas de ratones endogámicos con predisposición genética. La inducción de AR se realiza, esencialmente, a través de un compuesto con propiedades artritogénicas, por ejemplo, componentes bacterianos (290), aceites (291), antígenos ubicuos (292) o proteínas específicas del cartílago (290, 293-295). Además de los modelos de artritis inducida, existen modelos donde se desarrolla espontáneamente la enfermedad. En estos modelos se utilizan ratones deficientes o transgénicos para un gen específico y brindan información sobre el papel de determinados genes en el proceso de inflamación. Son una herramienta muy útil para estudiar el efecto de la terapéutica en ratones propensos a desarrollar espontáneamente inflamación articular (290).

Por tanto, y de forma general, los modelos para el estudio de AR se pueden clasificar en dos grandes categorías: modelos inducidos y modelos genéticos. En la tabla 1.7 se muestra un resumen de los modelos usados en ratones.

Clasificación	Modelo	Agente inductor/gen diana	Dependencia del MHC
Modelos inducidos	Artritis inducida por colágeno (CIA, del inglés "Collagen Induced Arthritis")	Colágeno tipo II, autólogo o heterólogo	$H2^q = H2^r > H2^b$
	Artritis inducida por anticuerpos anti-CII (CAIA)	Transferencia de anticuerpos específicos de colágeno tipo II	Independiente de MHC
	Artritis inducida por la pared celular estreptocócica (SCWIA)	Polímero de peptidoglicano (PG-PS), producido por <i>Streptococcus pyogenes</i>	$H2^k, H2^q, H2^d$
	Artritis inducida por pristano (PIA)	Pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano)	Nd
	Artritis inducida por antígeno	BSA u ovoalbúmina	Independiente de MHC

Clasificación	Modelo	Agente inductor/gen diana	Dependencia del MHC
	Artritis inducida por proteoglicanos (PGIA)	Proteoglicano de cartílago humano	Independiente de MHC
	Artritis inducida por glucosa.6.fosfato isomerasa (G6PI)	G6PI heteróloga	Independiente de MHC
Modelos genéticos	Ratones K/BxN	TCR específico para para un epítipo de ribonucleasa de páncreas bovino (KRN)	H2 ^{g7}
	Ratones SKG	Dominio SH2 del gen ZAP-70	Nd
	Ratones transgénicos para el gen del factor de necrosis tumoral humana (HTNFG)	TNF- α humano	Independiente de MHC
	Ratones IL-1ra ^{-/-}	Receptor de IL-1	Nd

Tabla 1.7 Modelos utilizados para la inducir AR. Nd= no determinado

1.3.4.1 CIA

Este es el modelo de artritis inducida mejor caracterizado y más utilizado. Comparte muchas características patológicas e inmunológicas similares con la AR humana (Tabla 1.8) (296-298). En el modelo CIA, la respuesta inmunitaria se dirige contra el antígeno articular colágeno tipo II (CII) (299). La inducción de artritis en CIA está mediada por las respuestas Th1 y Th17, siendo las células Th17, al parecer, las que desempeñan el papel patológico dominante (300). También, se observa falta de tolerancia y la generación de autoanticuerpos contra colágeno (301).

En 1977, se inmunizaron por primera vez ratas con una emulsión de CII humana, de pollo o de rata, en adyuvante completo de Freund (CFA, del inglés “Complete Freund’s Adjuvant”), lo que condujo al desarrollo de una poliartritis erosiva asociada con una respuesta autoinmune contra el cartílago (302). Posteriormente, otros grupos de investigación describieron protocolos similares para la inducción de CIA en ratones (293) y primates no humanos (303).

La susceptibilidad a CIA en ratones, al igual que en AR, está asociada con la expresión de moléculas de MHC de clase II específicas. Las cepas que expresan haplotipo H-2q (DBA/1) o H-2r (B10.RIII) son susceptibles a CIA (304, 305). Los DBA/1 (H-2q) responden a CII de pollo, murino, bovino, porcino y humano (306) y los B10.RIII (H-2r) responden exclusivamente a CII bovino y porcino (307, 308). No obstante, estudios posteriores han demostrado que es posible inducir artritis en ratones C57BL/6 (H-2b), utilizando CII de pollo (309, 310).

	Diferencias	Similitudes
CIA	Compromiso articular no simétrico Enfermedad transitoria No manifestaciones sistémicas.	Enfermedad poliarticular Susceptibilidad asociada al MHC-II <u>Patología articular:</u> Hiperplasia de la membrana sinovial Infiltración inmune sinovial Neutrófilos en el líquido sinovial Formación Pannus Destrucción ósea por osteoclastos <u>Marcadores serológicos:</u>
AR	Compromiso articular simétrico Enfermedad crónica Manifestaciones sistémicas extraarticulares.	FR Anticuerpos anti-CII ACPAs <u>Características inmunológicas:</u> Aumento de la expresión de citoquinas Generación de autoanticuerpos Mediado por células T

Tabla 1.8 Similitudes y diferencias entre la AR humana y la CIA.

Papel de los linfocitos T en CIA

Como se mencionó anteriormente, las células T juegan un papel importante en la patogénesis de la AR (298). Desde el punto de vista experimental, las evidencias han demostrado que la administración de células T específicas de CII puede inducir artritis en ratones sanos (311). Además, los ratones deficientes para células T CD4⁺ son menos susceptibles a CIA que los ratones de tipo

salvaje. Se ha demostrado que la deficiencia de células T CD8 no afecta la susceptibilidad a CIA (312). La administración de colágeno tipo II induce una fuerte activación de los linfocitos T, que a su vez, estimulan a los linfocitos B a producir anticuerpos (313).

Anteriormente, se consideró que las respuestas inmunitarias, tanto en la AR como en CIA, estaban mediadas por células Th1. Sin embargo, los estudios sobre el papel del IFN- γ endógeno, citoquina prototipo de la respuesta Th1, mostraron resultados contradictorios. Se descubrió que los ratones que carecen de IFN- γ R funcional no están protegidos sino que desarrollan una forma más severa de CIA (314). Recientemente, se ha implicado a las células Th17, que producen IL-17 e IL-22, en la patogénesis de CIA (315). La diferenciación a Th17 esta mediada por TGF- β , IL-6 e IL-23, mientras que IFN- γ suprime su diferenciación (316). La IL-17 promueve la inflamación en el modelo CIA al favorecer la producción de otras citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y RANKL (317). Otros estudios han mostrado que la neutralización de la IL-17 endógena por anticuerpos (318, 319) o la eliminación del gen IL-22 (320), protege contra la enfermedad, proporcionando así evidencia adicional sobre el papel de las células productoras de IL-17 en CIA.

Papel de los linfocitos B en CIA

Las células B pueden contribuir a la artritis inducida por CIA, al igual que en la patogénesis de RA, a través de la producción de autoanticuerpos, pero también promoviendo la secreción de citoquinas, como IL-6, o haciendo funciones de APCs para activar células T específicas frente a, fundamentalmente, CII. En el suero de animales artríticos, se han detectado anticuerpos contra diferentes proteínas, además del colágeno tipo II (313). Los isotipos de anticuerpos anti-CII que se encuentran elevados en CIA son IgG1 e IgG2a/c (309, 321) y dependen de la concentración de *Mycobacterium tuberculosis* del CFA (321). En ratones C57BL/6 se requieren dosis altas de *M. tuberculosis* para la activación y maduración de las CDs (322). Los anticuerpos específicos frente a CII producidos por las células B activadas inducen respuesta local inflamatoria mediada por macrófagos, granulocitos y células T, dando lugar a la destrucción de hueso y cartílago (323).

Se ha demostrado que los ratones deficientes en células B son resistentes a la artritis inducida por CIA (324). También, que la transferencia de suero de ratones artríticos a ratones sanos induce inflamación severa, y aunque el anticuerpo ya no se detecte, la respuesta inflamatoria persiste. Esto indica que la respuesta humoral tiene un papel fundamental en el establecimiento de la respuesta autoinmune en este modelo (325).

1.4 Cáncer colorrectal

1.4.1 Epidemiología

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo. Es el tercer cáncer más comúnmente diagnosticado a nivel mundial, con una incidencia de 1,8 millones de casos nuevos en 2018. Representa la cuarta causa de muertes relacionadas con el cáncer en todo el mundo, con aproximadamente 881.000 muertes (326, 327). Sin embargo, en los Estados Unidos y en otros países desarrollados, el CCR es la segunda causa más común de muerte por cáncer, a pesar de los importantes avances en detección temprana, cirugía y tratamiento de esta patología.

Con respecto al género, la prevalencia de CCR se comporta de manera muy similar en ambos sexos, aunque es ligeramente mayor en hombres (10,9 %) que en mujeres (9,5 %) (327). Además, el riesgo de desarrollar CCR aumenta con la edad. De hecho, más del 90 % de los pacientes diagnosticados tienen más de 50 años y la edad promedio de diagnóstico del CCR es de 64 años. La raza es también un factor que influye en la incidencia del CCR, siendo más elevado en personas de raza negra (327, 328).

Según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), en la población española el CCR es uno de los más frecuentemente diagnosticado (15 % del total), siendo detectados en 2017 aproximadamente 34.331 casos. En hombres, es el segundo más frecuente después del cáncer de próstata. En mujeres, el cáncer de mama es el más frecuentemente diagnosticado y en segundo lugar se sitúa el CCR. Con respecto a mortalidad, el primero en ambos sexos es el cáncer de pulmón, seguido del CCR, con 15.923 defunciones al año (329).

1.4.2 Clasificación

1.4.2.1 Estadificación

Los carcinomas colorrectales son clínicamente estadificados utilizando la clasificación TNM (tumor, ganglios linfáticos, metástasis), establecido por The American Joint Committee on Cancer (AJCC) (330).

La categoría T describe la extensión de la propagación a través de las capas que forman la pared del colon y el recto (Tis, T1, T2, T3, T4). La categoría N indica si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos (N0, N1, N2). La categoría M indica si hay metástasis a órganos distantes (MX, M0, M1). En la figura 1.9 se esquematizan las etapas del CCR según la clasificación TNM.

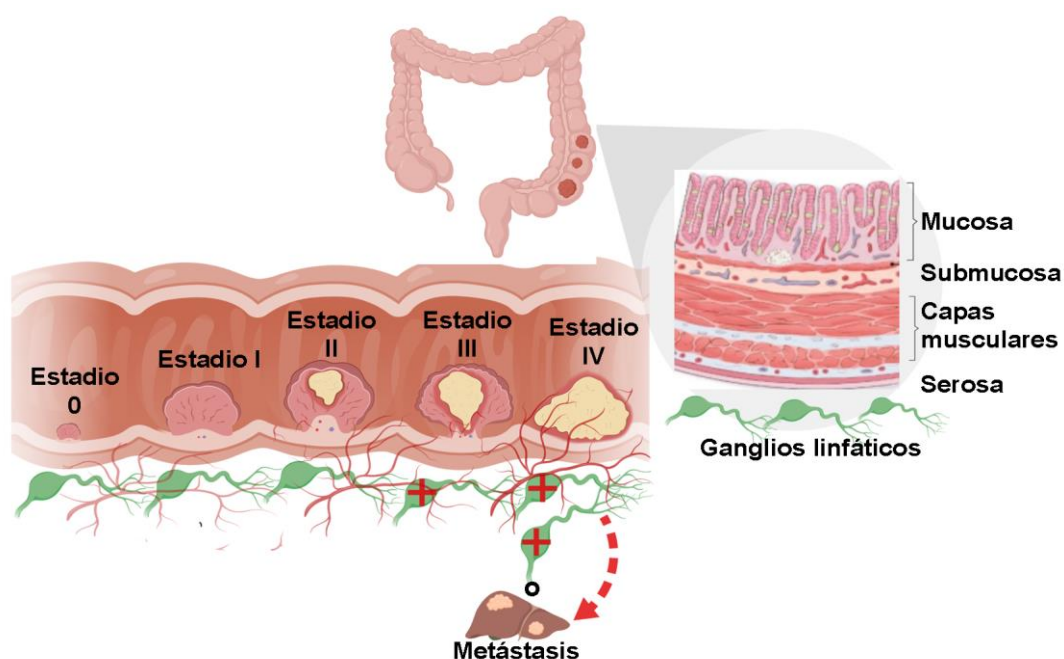


Figura 1.9 Estadios del CCR según la clasificación TNM establecida por AJCC. Estadio 0: cáncer en la etapa más temprana; No ha crecido más allá de la mucosa del colon o del recto. Estadio I: el cáncer ha crecido a través de la muscularis mucosa hasta la submucosa o también puede haber crecido en la muscular propia. Estadio II: el cáncer ha crecido en las capas más externas del colon o del recto, o las ha atravesado, pero no ha llegado a ganglios u órganos cercanos. Estadio III: el cáncer ha crecido a través de la mucosa hacia la submucosa, y también puede haber crecido hacia la muscularis propia. Se ha diseminado a ganglios linfáticos cercanos o en áreas de grasa cerca de los ganglios linfáticos. No se ha propagado a sitios distantes. Estadio IV: el cáncer se ha diseminado a 1 o más órganos distantes, o a un grupo distante de ganglios linfáticos, y puede o no, haberse diseminado a partes distantes del peritoneo.

1.4.2.2 Clasificación según los Subtipos Moleculares de Consenso de CCR (CMSs)

El CCR es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista biológico y las variadas tasas de respuesta a los regímenes terapéuticos estándar sugieren que es molecularmente heterogéneo.

En un esfuerzo por relacionar el fenotipo de las células cancerosas con el comportamiento clínico de la enfermedad, y con el objetivo de establecer un tratamiento racional usando terapias específicas, el consorcio de subtipos de CCR unificó, en un único sistema de consenso, a seis sistemas de clasificación molecular independientes (331, 332). Este consenso dio lugar a la conformación de cuatro grupos diferentes, conocidos como subtipos moleculares de consenso (CMS, del inglés “Consensus Molecular Subtypes”) (333) y su clasificación se basa en las características epigenómicas, transcriptómicas, microambientales, genéticas y clínicas de los tumores.

	CMS1	CMS2	CMS3	CMS4
Nombre alternativo	MSI, inmune	canónica, epitelial	metabólico	Mesenquimal
Características	MSI Activación inmunológica Hiper-metilaciones Hiper-mutaciones Mutaciones en BRAF Bajo CAFs	CIN MSS Alta SCNA Baja metilación Activación de Wnt y MYC Muy bajo CAFs Poco Inmunogénico	CIN Baja SCNA Moderada metilación Mutaciones en KRAS Bajo CAFs Altamente inmunogénico Desregulación metabólica	CIN MSS Alta SCNA Baja metilación Activación de TGF- β Alto CAFs Inflamación EMT Invasión estromal y angiogénesis
Incidencia	14 %	37 %	13 %	23 %

Tabla 1.9 Resumen de las principales características de los CMSs del CCR establecidos en el consorcio internacional. MSI: inestabilidad de microsatélite (del inglés, “Microsatellite Instability”). CAFs: fibroblastos asociados a cáncer (del inglés, “Cancer-Associated Fibroblasts”). CIN: inestabilidad cromosómica (del inglés, “Chromosomal Instability”). MSS: estabilidad de microsatélite (del inglés, “Microsatellite Stability”). SCNA: alteraciones somáticas del número de copias (del inglés, “Somatic Copy-Number Alterations”). EMT: transición epitelio mesénquima (del inglés, “Epithelial Mesenchymal Transition”).

En la tabla 1.9 se muestra un resumen de las principales características del CCR según la clasificación de los CMSs establecidos en el consorcio internacional CRCSC (del inglés, “Colorectal Cancer Subtyping Consortium”).

1.4.3 Etiología. Factores de riesgo

El CCR es una enfermedad heterogénea, con respecto a la localización anatómica del tumor, las diferencias genéticas, raciales y también por la influencia del el estilo de vida implicadas en su desarrollo. Por tanto, el CCR se considera una enfermedad compleja en donde participan factores de riesgos genéticos y ambientales.

1.4.3.1 Factores hereditarios

La mayoría de los CCR se diagnostican en personas sin antecedentes familiares de CCR y son de origen esporádico, los restantes se relacionan con la historia familiar y/o enfermedades intestinales inflamatorias (334). Aproximadamente una tercera parte de todos los casos familiares de CCR tienen una etiología genética bien definida (335). El riesgo de padecer CCR en personas con antecedentes familiares varía en función del grado de parentesco con el familiar afectado y la edad en la que dicho familiar desarrolló el cáncer (336).

Los principales síndromes hereditarios asociados con el CCR son: el síndrome de Lynch (CCR hereditario sin poliposis o HNPCC), que es la forma más común de cáncer de colon hereditario, responsable de aproximadamente un 2 % de todos los casos de CCR (337), y la poliposis adenomatosa familiar (FAP, del inglés “Familial Adenomatous Polyposis”), causada por mutaciones en el gen APC (338). También hay otros síndromes hereditarios menos comunes que incrementan el riesgo de CCR.

Existe un 20-30 % de todos los casos de CCR que se presenta en pacientes con antecedentes familiares de CCR, sin embargo estos no cumplen los criterios de CCR hereditario, lo que indica cierta susceptibilidad genética. A aquellos CCR con diverso grado de agregación familiar se les denomina CCR

familiar, y se distingue de los síndromes mencionados anteriormente por no seguir un patrón de herencia tan bien definido (339).

1.4.3.2 Factores ambientales o factores relacionados con el estilo de vida

Dieta

La dieta contribuye al desarrollo del CCR, jugando un papel adverso o protector en su desarrollo, independientemente de la obesidad. La dieta tiene un impacto significativo en el microbioma del colon, donde las bacterias superan en número a las células huésped (10:1). Diferentes alimentos tienen efectos variados sobre la microflora y la inflamación intestinal (340).

El consumo de carne roja, carne procesada y carne cocinada muy hecha o en contacto directo con el fuego se ha asociado a un mayor riesgo de sufrir CCR (341). En 2015, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) otorgó a la carne procesada la categoría de "carcinógena" y la carne roja como "probablemente carcinógena", principalmente debido a su impacto en el riesgo de CCR (342).

Por otro lado, una dieta rica en fibra, vegetales, frutas, leche u otros productos lácteos (el calcio que estos alimentos contienen) parece ejercer un efecto protector. Una dieta rica en fibra puede reducir el riesgo de CCR al disminuir el pH del colon sigmoide, reducir el tiempo de tránsito del colon y, por lo tanto, minimizar la exposición a posibles carcinógenos (343). Se ha demostrado asociación entre el aumento del consumo de frutas y verduras y la reducción del riesgo de CCR (344). El efecto protector contra el CCR es debido a la gran cantidad de fibra, ácido fólico, antioxidantes y vitaminas que poseen estos alimentos (345).

Actividad Física y Obesidad

Diversos estudios, realizados en diferentes poblaciones, muestran que los individuos físicamente más activos, especialmente si lo son durante largos periodos de tiempo, presentan un menor riesgo de CCR, con una reducción de la incidencia de hasta un 50 % (346).

Por otro lado, un gran número de estudios epidemiológicos sugieren que la obesidad, es un factor de riesgo para el CCR, mientras que la pérdida de peso se convierte en un factor protector (347).

Tabaquismo

Estudios recientes muestran que el consumo de tabaco, es un factor de riesgo para el CCR en ambos sexos, existiendo una clara asociación entre el tabaquismo, los adenomas colorrectales y el CCR (348).

Consumo de alcohol

El consumo moderado a alto de alcohol se asocia con un mayor riesgo de CCR (348). Los mecanismos por los cuales el alcohol actuaría como carcinógeno en el colon incluyen: el incremento de la proliferación mucosa, la activación de sustancias pro-carcinógenas en el intestino, cambios en la composición de la bilis y elevación de la concentración de nitrosaminas (349).

En la tabla 1.10 se muestra un resumen de los factores relacionados con el estilo de vida y que influyen aumentando o disminuyendo el riesgo a padecer CCR.

Aumentan el riesgo de CCR	Disminuyen el riesgo de CCR
Carnes procesadas y carnes rojas Modo de cocción.	Dieta rica en fibra, frutas y verduras Calcio y suplementos de calcio en la dieta Niveles adecuados de vitamina D Niveles adecuados de ácido fólico
Obesidad Sedentarismo	Actividad física
Tabaquismo	
Consumo moderado-elevado de alcohol	

Tabla 1.10 Resumen de los factores relacionados con el estilo de vida que influyen en el riesgo de CCR.

1.4.3.3 Antecedentes médicos personales

Uso de medicamentos

Varios estudios han demostrado que el uso prolongado de aspirina, y otros fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINEs), reduce el riesgo de CCR (348, 350-352), debido a que disminuyen la inflamación intestinal. Sin embargo, el

alcance del beneficio no se ha cuantificado, y los AINEs se asocian con un mayor riesgo de hemorragia gastrointestinal (350, 351, 353), por lo que no se recomiendan para la prevención del CCR en la población general (348, 354).

Los efectos protectores del uso de hormonas posmenopáusicas y los anticonceptivos orales siguen siendo controvertidos (355). Otros medicamentos han sido asociados a un menor riesgo de padecer CCR, por ejemplo, los bifosfonatos orales (BPs) (356) y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) (357).

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

Enfermedad inflamatoria del intestinal (EII) es un término amplio, que describe un grupo de entidades clínicas, que se caracterizan por ser procesos inflamatorios crónicos, de etiología desconocida y que, fundamentalmente, afectan al intestino. Las dos enfermedades inflamatorias más comunes del intestino son la colitis ulcerosa (UC, del inglés “Ulcerative Colitis”) y la enfermedad de Crohn (EC).

Los pacientes con EII tienen un riesgo doble de desarrollar CCR. La inflamación, característica fundamental en estas afecciones, provoca la liberación crónica de citoquinas, exceso de flujo sanguíneo, radicales libres y otros factores que predisponen a la carcinogénesis (358). El CCR es responsable de 1/6 de las muertes relacionadas con UC y de 1/12 de todas las muertes en pacientes con EC (359). Hay otros factores que pueden estar asociados con el riesgo de desarrollar CCR en pacientes con EII, por ejemplo, el riesgo aumenta con el inicio temprano de la enfermedad (antes de los 15 años) (360) y en enfermedad extensa de larga duración. Además, la gravedad y persistencia de la inflamación también es un factor clave que aumenta el riesgo de CCR (361).

Los pacientes con UC presentan un mayor riesgo de padecer CCR que los pacientes con EC (362). En la UC, el riesgo de desarrollar CCR depende de la duración y el alcance de la enfermedad. Además, otros factores, como el sexo masculino, la edad joven en el momento del diagnóstico, la presencia de colangitis esclerosante primaria y la extensión de la colitis aumentan el riesgo de

CCR. Un metaanálisis, donde se incluían ocho estudios diferentes, mostró que la UC aumenta el riesgo de CCR en 2,4 veces (363). En general, el riesgo de CCR en pacientes con UC tiene una tendencia creciente. Por ejemplo, a los 10, 20 y 30 años después del diagnóstico de UC, el riesgo de CCR es de 2 %, 8 % y 20 %, respectivamente (364, 365).

1.4.4 Mecanismos mutacionales asociados al desarrollo de CCR

Dentro de los mecanismos mutacionales asociados al CCR se hallan los epigenéticos (metilación del DNA) y la inestabilidad genómica, la cual se divide en: inestabilidad cromosómica (CIN) e inestabilidad de microsatélites (MSI) (334, 366).

1.4.4.1 Mecanismos epigenéticos

Se trata de cambios epigenéticos en el DNA, que inactivan la expresión génica e incluyen la metilación de las islas CpG (del inglés, "Cytosine preceding Guanine") en secuencias promotoras, modificaciones en proteínas como las histonas e hipometilación global. La metilación del DNA es la segunda vía genética más común en el CCR esporádico, se presenta aproximadamente en 15 % de los casos (367, 368). Se ha descrito que estos ocurren en estadios tempranos de la carcinogénesis colorrectal (369). La hipermetilación de secuencias promotoras conlleva al silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumor y genes involucrados en el control del ciclo celular, la reparación de DNA y la apoptosis. La metilación de las islas CpG es un mecanismo que afecta a la expresión de los genes de reparación de DNA, (MMR, del inglés Mismatch Repair) (369, 370). La hipometilación de los promotores de algunos genes ocurre en estadios avanzados del CCR y se caracteriza por el aumento en la transcripción génica (368).

1.4.4.2 CIN

La inestabilidad cromosómica es el mecanismo que más comúnmente ocurre en el CCR esporádico (70-85 %); también conocido como la vía supresora. Es el mecanismo más acorde con el modelo genético propuesto por Fearon y Vogelstein (371). La inestabilidad cromosómica conlleva diversos

cambios en el número de copias y la estructura cromosómica, ocasionando pérdida de heterocigocidad (LOH, del inglés “Loss of Heterozygosity”) y mutaciones en genes supresores de tumores y protooncogenes (372).

1.4.4.3 MSI

Conocida como la vía mutadora, ocurre en el 15 % de los casos de CCR. Se caracteriza por fallos en los mecanismos de reparación de bases mal apareadas del DNA (MMR), principalmente por fallo en la complementariedad de bases. Esto genera la aparición de mutaciones puntuales e inserciones-delecciones (IDL) que cambian el marco de lectura y producen un codón de parada prematuro, que codifica para una proteína no funcional (373). El sistema MMR está conformado por siete genes: hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 y hPMS2; hasta la fecha se han descrito más de 500 mutaciones diferentes en estos genes MMR. Los genes hMLH1 y hMSH2 son los más importantes del sistema MMR relacionados con el CCR, en los cuales ocurren más del 90 % de las mutaciones (373).

1.4.5 Inflamación y cáncer colorectal

La conexión entre la inflamación y la tumorigénesis está bien establecida, por lo que la inflamación crónica se ha convertido en una de las características distintivas del cáncer (374). Muchos tumores surgen después de una inflamación prolongada o muestran características de inflamación crónica a lo largo de su progresión (375, 376). El CCR es uno de los mejores ejemplos de un tumor estrechamente asociado con la inflamación crónica, que puede estar presente desde las primeras etapas de la aparición del tumor.

La EI es un factor de riesgo importante para el desarrollo del cáncer de colon y también la inflamación está involucrada en otras formas de cáncer de colon esporádico y hereditario. A pesar de que los casos de CCR hereditarios rara vez están precedidos por una inflamación crónica manifiesta, se pueden prevenir o retrasar con medicamentos antiinflamatorios (348, 350, 377, 378), lo que sugiere la participación de procesos inflamatorios en el desarrollo del tumor.

El cáncer asociado a colitis (CAC) es la complicación más grave de la EII, y aunque constituyen solo un 1-2 % de todos los casos de CCR, es difícil de tratar, tiene una alta mortalidad y con frecuencia se diagnostica en etapas avanzadas de la enfermedad (348). El riesgo de padecer CAC es de 1,5 a 2,4 veces mayor en los pacientes con EII que en la población normal (348, 379). Este riesgo se incrementa con los años, siendo del 18,4 % a los 30 años después del inicio de la UC (364, 379). Aproximadamente el 10-15 % de los pacientes con EII morirá de CAC (380). Sin embargo, las últimas evidencias parecen indicar que la detección temprana de la EII y el tratamiento con antiinflamatorios reducen el riesgo de CAC, lo que confirma la implicación de la inflamación en la carcinogénesis colorrectal (379, 381).

1.4.5.1 patogenia molecular del CAC. Diferencias con el CCR esporádico y hereditario

El desarrollo de CCR generalmente sigue varios pasos consecutivos. Algunas de estas etapas esenciales del desarrollo del cáncer, incluida la formación de focos de criptas aberrantes (FCA), pólipos, adenomas y carcinomas, son similares entre CAC y el CCR no inflamatorio. Sin embargo, se han propuesto algunas secuencias patógenas diferentes para el CAC, incluida la inflamación crónica y la displasia, que surge sin la formación de un adenoma bien definido. Así, la secuencia de "adenoma-carcinoma" establecida para el CCR esporádico, se convierte en la secuencia de "inflamación-displasia-carcinoma" en la EII pre-existente (371) (Figura 1.10).

Las vías genéticas y de señalización comunes, como las relacionadas con Wnt, β -catenina, K-ras, p53, APC, TGF- β y las proteínas MMR, están alteradas tanto en el CCR como en CAC. Sin embargo, las diferencias en el tiempo y la frecuencia de mutaciones y silenciamiento en p53 y APC, así como la activación de K-Ras pueden diferir entre CCR y CAC (380).

Por ejemplo, la pérdida de función de APC, considerada como un evento temprano muy común en CCR esporádico, es mucho menos frecuente y generalmente ocurre tarde en la secuencia de displasia-carcinoma asociada a EII (382). Por otro lado, varios estudios sugieren una mayor implicación de p53, lo que indica que juega un papel fundamental en CAC. En el contexto de la colitis, las mutaciones de p53 son un cambio molecular que ocurre de manera temprana y a menudo se detectan en la mucosa de pacientes con UC, sin displasia o indefinida para la displasia (382).

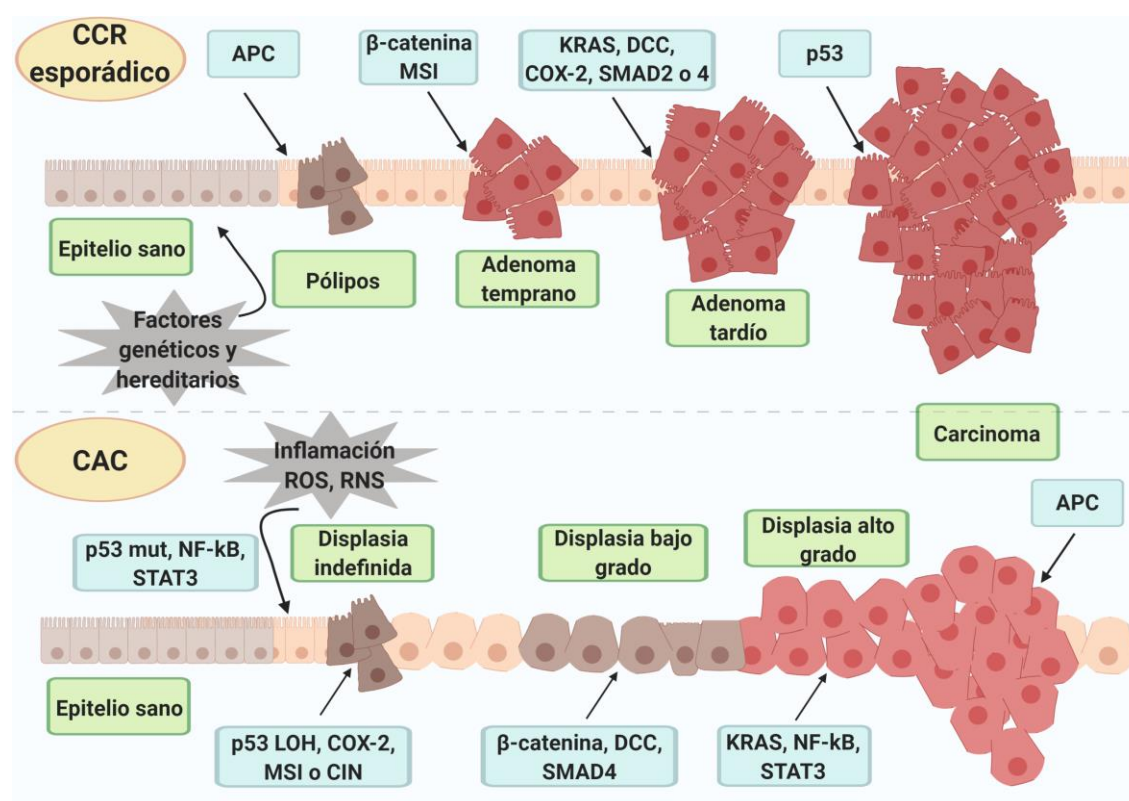


Figura 1.10 Comparación de alteraciones moleculares en CCR esporádico y CAC. (Adaptado de (383)).

1.4.5.2 Inflamación en la iniciación de CAC

En el caso del CAC, la inflamación pre-existente en pacientes con EII, es la primera etapa que induce los cambios celulares pre-neoplásicos. El microentorno inflamatorio localizado puede promover la acumulación de mutaciones y cambios epigenéticos, favoreciendo transformaciones neoplásicas adicionales.

Las células inflamatorias activadas producen ROS y RNS, que pueden inducir daño y mutaciones en el DNA. Además, las citoquinas y otros factores,

pueden estimular la producción de ROS dentro de las células epiteliales, lo que aumenta la probabilidad de mutaciones y silenciamiento epigenético de genes supresores de tumores (384, 385) (Figura 1.11A).

Aún no han sido completamente esclarecidos los mecanismos moleculares por los cuales la inflamación promueve el desarrollo del cáncer (386, 387). Sin embargo, se sabe que la exposición a ROS, a los mediadores producidos por la actividad de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), como la prostaglandina E2 (PGE2), y varias citoquinas pro-inflamatorias, causa la inactivación de genes supresores de tumores o, por el contrario, la activación de los oncogenes. También pueden causar inactivación o represión de los genes MMR y las ROS pueden oxidar e inactivar directamente las enzimas reparadoras de daños (388, 389).

Por su parte, el silenciamiento epigenético, a través de la metilación del DNA y las histonas, o el silenciamiento mediado por microRNA, reduce la expresión de proteínas que mantienen la fidelidad durante la replicación del DNA o actúan como supresores de tumores, promoviendo el desarrollo de CAC (386-388).

En conjunto, las alteraciones genéticas impulsadas por la inflamación y los cambios epigenéticos son aspectos importantes de la iniciación del tumor en el CCR y, especialmente, en la CAC.

1.4.5.3 Inflamación en la progresión de CAC

La promoción tumoral es el proceso de crecimiento de un tumor a partir una única célula transformada hasta la formación de un tumor primario completamente desarrollado. Tanto el crecimiento inicial como continuo del tumor depende del aumento de la proliferación celular y la reducción de la muerte celular, ambas estimuladas por la inflamación (390) (Figura 1.11B).

Los factores de transcripción NF- κ B y STAT3 se activan en CAC y actúan como oncogenes no clásicos, cuya activación en células malignas rara vez es el resultado de mutaciones directas. Esto indica que estos factores de transcripción se activan de manera paracrina o autocrina, o tras la activación de componentes de sus vías de señalización. NF- κ B y STAT3 activan los genes que controlan la

supervivencia, proliferación y crecimiento de las células, así como la angiogénesis, la invasividad, la motilidad, la producción de citoquinas y quimioquinas (391, 392). Se ha detectado activación aberrante de ambos factores de transcripción en aproximadamente el 50 % de los CCR y CAC (393, 394).

Existe amplia evidencia que demuestra que STAT3 desempeña un papel primordial en la progresión del CAC. Se ha demostrado que citoquinas como la IL-6, IL-11 o la IL-22 y varios factores que influyen en el crecimiento del tumor, como factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés “Epidermal Growth Factor”), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, del inglés “Hepatocyte Growth Factor”) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés “Vascular Endothelial Growth Factor”), directa o indirectamente causan la activación de STAT3 (6, 395). La activación de STAT3 induce la expresión de genes antiapoptóticos, como Bcl-2 o Bcl-xL, además induce la expresión de genes proliferativos como la ciclina D1 o c-Myc, y VEGF, que es un potente factor proangiogénico (396). STAT3 activado también puede inducir una activación prolongada de NF- κ B, una peculiaridad importante en la patogénesis del CAC, ya que estos dos factores de transcripción activan los genes necesarios en cada paso del desarrollo del cáncer (394, 397).

Se ha encontrado que la activación de NF- κ B en las células mieloides (especialmente los macrófagos y CDs de la lámina propia), da como resultado la producción de citoquinas que son fundamentales en el crecimiento y proliferación del tumor, promoviendo la supervivencia de células epiteliales pre-malignas generadas durante las etapas tempranas de la tumorigénesis del CAC (398). Se conoce que la actividad antiapoptótica de NF- κ B está mediada por la activación de Bcl-2, Bcl-xL y cFLIP, junto con otros genes (399). La inactivación de NF- κ B en células mieloides mediante la ablación de IKK β , la quinasa requerida para su activación, inhibió la producción de mediadores inflamatorios, incluidas citoquinas como la IL-6 y el TNF- α , e impidió la proliferación de células epiteliales durante la inducción de CAC. Como resultado, la carga tumoral se redujo debido a la aparición de menos tumores, de menor tamaño (398).

1.4.5.4 Inflamación en la invasión y metástasis del CAC

Desde la perspectiva clínica, la metástasis es la situación más crítica del cáncer, ya que más del 90 % de la mortalidad por cáncer es causada por metástasis. Estudios recientes muestran que la metástasis requiere una colaboración estrecha entre las células cancerosas, las células inmunitarias e inflamatorias y los elementos del estroma.

El microentorno inflamatorio puede influir en varias etapas claves de la metástasis. El primer paso que debe ocurrir es la EMT (del inglés, “Epithelial Mesenchymal Transition”), en la que las células cancerosas adquieren características fibroblastoides, por tanto aumentan su motilidad y capacidad de invasión (400, 401). Este proceso está regulado por varias citoquinas pro-inflamatorias, incluida la IL-1, TNF- α , IL-6, el factor 1 α inducible por hipoxia (HIF-1 α , del inglés “Hypoxia-Inducible Factor 1 α ”) y, principalmente, por TGF- β (400-402) (Figura 1.11C).

La activación de la señalización de NF- κ B y/o STAT3 puede facilitar la EMT al aumentar significativamente la movilidad de las células premetastásicas, favoreciendo su migración e invasión. Este proceso está mediado por el efecto de estos factores de transcripción sobre la expresión de los reguladores de la EMT, y también por la capacidad de ambos para regular el citoesqueleto (400-402).

En el segundo paso hacia la metástasis, las células cancerosas se introducen en vasos sanguíneos y linfáticos. La inflamación puede promover esto a través de la producción de mediadores que aumentan la permeabilidad vascular. Posteriormente, las células que inician la metástasis sobreviven y viajan a través de la circulación. Por otra parte las integrinas permiten la extravasación de células cancerosas circulantes y, finalmente, los progenitores metastásicos individuales interactúan con las células inmunitarias, inflamatorias y estromales y comienzan a proliferar (403).

Las quimioquinas pueden estimular directamente la migración de las células malignas hacia los vasos sanguíneos y órganos distantes. El receptor de quimioquina CXCR3 es fundamental para la metástasis en los ganglios linfáticos

(404) y sus niveles se incrementan drásticamente durante la malignización (404). Dentro de las quimioquinas que activan el receptor CXCR3 durante la metástasis se incluyen CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CCL21, las cuales se regulan mediante la señalización de proteínas oncogénicas tales como Ras (405).

Las señales inflamatorias, además, regulan la producción y actividad de las MMPs, y facilitan la invasión y extravasación de células cancerosas (406). Los CCR humanos sobreexpresan MMPs 1, 2, 3, 7, 9 y 13. Varias citoquinas pro-inflamatorias pueden aumentar la expresión de distintas MMPs, lo que proporciona un estímulo para el aumento de la migración celular. Las citoquinas más implicadas, aunque no las únicas, son TNF- α y TGF- β (6).

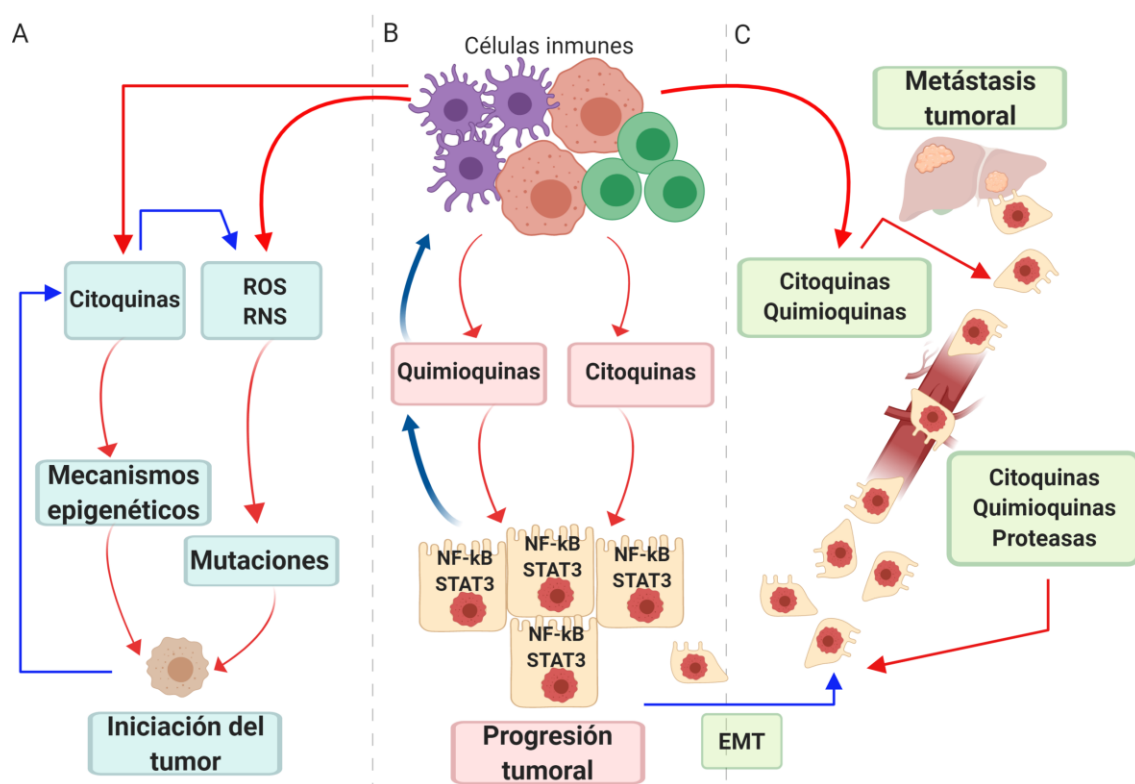


Figura 1.11 Papel de la inflamación en la iniciación (A), promoción (B) y metástasis (C) de CCR.

1.4.5.5 Citoquinas en CCR

Las citoquinas producidas por células inmunitarias, fibroblastos, células estromales y células epiteliales cancerosas tienen funciones diversas y pleiotrópicas en las diferentes etapas de la progresión del CCR. En las primeras etapas de la tumorigénesis, varias citoquinas potencian las respuestas

citotóxicas de los linfocitos T CD8+ y las células NK. Además, pueden inducir la liberación de IFN- γ , inhibir la angiogénesis e impedir el crecimiento y la diseminación de las células cancerosas. Todos estos efectos mediados por citoquinas inhiben la progresión del tumor. Sin embargo, en tumores bien establecidos, muchas citoquinas pueden promover la progresión del tumor favoreciendo la proliferación, inhibición de la apoptosis, la angiogénesis, la reorganización estromal, facilitar EMT, así como la metástasis y supresión de inmunidad antitumoral. En la mayoría de los casos, las citoquinas promotoras de tumores actúan de manera paracrina, aunque varios tipos de células cancerosas producen sus propias citoquinas, incluida la IL-6, para lograr el mismo efecto (6, 407). De forma general, las citoquinas promotoras de tumores son producidas por los macrófagos de la lámina propia y las CDs durante los estados tempranos del desarrollo de la CAC o por las células T durante la progresión del tumor y en etapa tardía (6, 395).

Las citoquinas, como el TNF- α e IL-6, son consideradas trascendentales en el CCR, debido al papel que desempeñan en la activación de los factores de transcripción oncogénicos NF- κ B y STAT3, respectivamente, en células epiteliales intestinales (IECs, del inglés “Intestinal Epithelial Cells”), promoviendo la proliferación y resistencia a la apoptosis (391). Por el contrario, otras citoquinas, como el IFN- γ y la IL-15, promueven la inmunidad protectora mediada por las células citotóxicas. Por otra parte la producción de las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- β , por las células Treg, son esenciales en el control de la inflamación intestinal. No obstante, el papel supresor de las células Treg puede ser perjudicial debido al deterioro de las respuestas inmunitarias protectoras (408). En la figura 1.12 se muestra los efectos de las principales citoquinas involucradas en CCR.

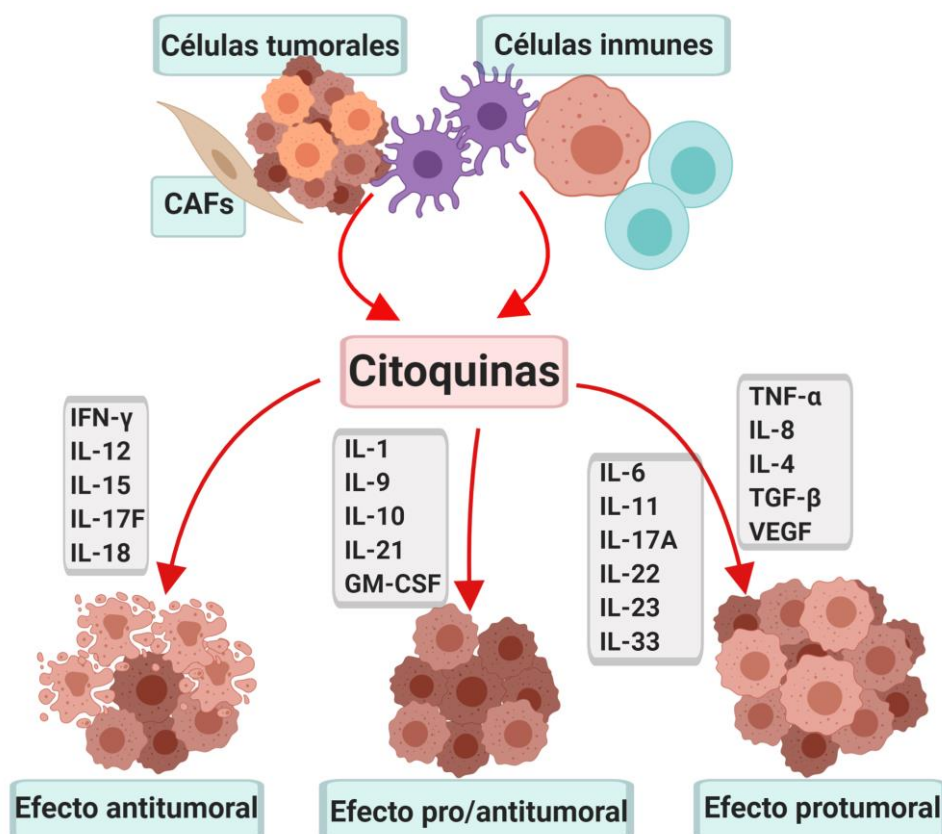


Figura 1.12 Propiedades de las citoquinas en la patogénesis del CCR (adaptado de (409).

TNF- α

El factor de necrosis tumoral α (TNF- α , del inglés “Tumor Necrosis Factor”) es una citoquina proinflamatoria, que desempeña un papel importante en diversos eventos celulares, incluida la proliferación celular, la diferenciación y la muerte celular (410). Aunque el TNF- α se identificó por primera vez como una citoquina supresora de tumores, debido a su capacidad para inducir muerte celular en ciertos tipos de células, las evidencias han demostrado que también puede actuar como agente promotor de tumores que vincula la inflamación y el cáncer (411, 412). Las principales fuentes de producción de TNF- α en procesos inflamatorios son de linaje monocitos/macrófagos. Sin embargo, otros tipos de células también pueden producir TNF- α , incluidos mastocitos, linfocitos T y B, células NK, neutrófilos, células endoteliales, células musculares lisas y cardíacas, fibroblastos y osteoclastos (413).

La unión del TNF- α a sus receptores TNFR1 y TNFR2 conduce al reclutamiento de proteínas intracelulares que activan múltiples vías de

transducción de señales: las señales asociadas a FAS, a través del dominio de muerte (FADD)/caspasa 8/caspasa 3, la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK, del inglés “Mitogen Activated Protein Kinase”), de la quinasa Jun (JNK)/proteína de activación 1 (AP-1), y la vía NF- κ B (409, 410). La activación de MAPK, JNK/AP-1 y NF- κ B inducen la expresión de varias moléculas que incluyen las citoquinas IL-1, IL-6, varias quimioquinas, moléculas de adhesión, COX-2 y MMPs. Cuando el TNF- α se une a su receptor TNFR1 también puede ocurrir un tipo de muerte programada denominada necroptosis. Que la necroptosis se desencadene dependerá de diferentes factores como el nivel de activación de la caspasa-8 y la fosforilación de proteínas como RIPK1 (del inglés, “Receptor Interacting Protein Kinase 1”), RIPK3 (del inglés, “Receptor Interacting Protein Kinase 3”) y de MLKL (del inglés, “Mixed Lineage Kinase domain-Like protein”) (414).

Se ha comprobado expresión incrementada de TNF- α en el colon de pacientes con UC activa y CCR avanzado, pero no en la mucosa normal. Además, los niveles séricos de TNF- α se han correlacionado de manera directa con la progresión de CCR y la supervivencia reducida de los pacientes con CCR (415, 416).

El TNF- α aumenta la permeabilidad vascular, lo que facilita la intravasación y extravasación de núcleos metastásicos (417, 418). La señalización del TNF- α también induce EMT, por tanto favorece metástasis, ya que estabiliza al factor de transcripción SNAIL-1, previniendo su degradación (419).

IL-1

La familia de citoquinas IL-1 comprende 11 miembros. Estos incluyen citoquinas con actividad agonista (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ), miembros con actividad antagonista del receptor (IL-1R α , IL-36R α , IL-38), y con actividad antiinflamatoria (IL-37) (420).

Las citoquinas de la familia IL-1 se expresan en todo el tracto gastrointestinal (TGI), desempeñando un papel esencial en la regulación de la inmunidad de la mucosa contra los patógenos intestinales (420, 421). Las más estudiadas de la familia son IL-1 β , IL-1 α , IL-18 e IL-33.

IL-1 α

A diferencia del precursor de IL-1 β , el precursor de IL-1 α es completamente activo y funciona como una "alarma" al iniciar rápidamente una respuesta inflamatoria, mediando así las fases tempranas de la inflamación (422). Además del precursor de IL-1 α liberado por las células necróticas, hay una forma de membrana de IL-1 α presente en los monocitos activados (420).

La propia IL-1 α puede actuar como una oncoproteína, y la expresión de la misma induce cambios neoplásicos en las células. La IL-1 α de macrófagos y CDs puede inducir el reclutamiento de neutrófilos (420, 421). La IL-1 α producida por las células cancerosas del colon puede aumentar la angiogénesis mediante la modulación de las células estromales en el microentorno tumoral (423).

IL-1 β

Durante la EII, las CDs y los macrófagos de la lámina propia secretan ingentes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-1 β y la IL-18, después de ser activadas por el inflamasoma, en respuesta a la presencia de microbiota comensal o a la señalización de receptores tipo Toll (TLR, del inglés "Toll-Like Receptors") (424).

El inflamasoma es un complejo proteico, formado básicamente por una molécula sensora (generalmente un receptor NLR), la proteína adaptadora ASC (del inglés, "Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a CARD) y la procaspasa-1. La activación del inflamasoma posibilita la proteólisis de la caspasa-1, que se encuentra en forma de procaspasa-1 inactiva (425). Una vez activada, la caspasa-1 proteoliza a la pro-IL-1 β y a la pro-IL-18, generándose las formas activas de estas dos importantes citoquinas proinflamatorias (Figura 1.1) (425).

Se han encontrado niveles altos de IL-1 β en varios tipos de cáncer y durante la progresión de CCR (426). Esta citoquina es un potente activador de la vía NF- κ B (427, 428). La IL-1 β puede también activar la ruta de Wnt- β -catenina en el CCR, inactivando GSK3 β , induciendo EMT y características de célula madre, como la capacidad de formación de colonias, la expresión de genes de células madre (BMI1 y NES) y el incremento a la resistencia frente a la

quimioterapia. En este proceso juega un papel primordial el factor de transcripción pro-mesenchimal ZEB1 (426, 427).

Además, se ha reportado que los transcritos de IL-1 β están aumentados en las biopsias de tumores de pacientes con CCR metastásico (429) y que polimorfismos en el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1R α) pueden asociarse con CCR (430).

El bloqueo in vivo de IL-1 β usando IL-1R α recombinante disminuyó significativamente el desarrollo de tumores en el modelo DSS/AOM (431), lo que indica un papel pro-tumorigénico de IL-1 β en este contexto. La IL-1 β puede actuar directamente sobre las IECs (431) y sobre las células tumorales (427) para inducir su proliferación. Asimismo, IL-1 β promueve el reclutamiento de MDSCs, lo que promueve la progresión de CCR (6, 391, 407, 420).

La IL-1 β también desempeña un papel importante en la angiogénesis del tumor, actuando indirectamente sobre las células endoteliales (432, 433). IL-1 β favorece la supervivencia de las células endoteliales mediante la estimulación de las células del músculo liso vascular para secretar VEGF (434). En resumen, la evidencia sugiere que IL-1 β es un activador indirecto de las células endoteliales y la angiogénesis, a través de la regulación de las moléculas pro-inflamatorias y angiogénicas.

IL-18

Descrita por primera vez en 1989 como "factor inductor de IFN- γ ", la IL-18 está estrechamente relacionada con la IL-1 β , ya que ambas se sintetizan primero como precursores inactivos, necesitando caspasa-1 para su escisión (420). Las dos pueden ser procesadas extracelularmente por proteinasa-3 y ambas tienen receptores señuelo. Similar a IL-1 α , el precursor de IL-18 se encuentra en casi todas las células mesenquimales en humanos y ratones (435).

La IL-18 es un componente importante de la respuesta de las células Th1 y de las células NK. Estudios recientes sugieren un efecto protector de la IL-18 en el CAC, al favorecer la respuesta Th1 y la activación de los CTL (436, 437). No obstante, la IL-18 se ha implicado en varias enfermedades, incluyendo EII (420, 438).

IL-23

La IL-23 es una citoquina de la familia de la IL-12, producida por las APCs durante la inflamación intestinal. Es considerada regulador crítico de la EII en humanos y en varios modelos murinos de colitis (424, 439).

Los niveles de IL-23 se elevan en el suero de pacientes con CCR, y se correlacionan positivamente con la expresión de VEGF (440). Altos niveles de IL-23, en tejido tumoral primario, fueron predictivos de una mayor tasa de metástasis del CCR (441).

La IL-23 prolonga la actividad de las células Th17 locales (442) y posiblemente suprime la función de las células Tregs (443). Es posible que la IL-23 controle la expresión de varias citoquinas pro-inflamatorias y pro-tumorigénicas, como la IL-6, la IL-17 y la IL-22, y estas citoquinas transmitan el efecto oncogénico de la IL-23 en el microambiente tumoral (444, 445). Estas citoquinas pueden a su vez activar la proliferación de células tumorales a través de STAT3 y NF- κ B.

IL-17

La IL-17 es una citoquina que une a los sistemas inmunitarios adaptativos e innatos. La familia de la IL-17 contiene 6 miembros: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F (446). Las células Th17 desempeñan un papel importante en la defensa del huésped contra los microorganismos extracelulares, pero también participan en patologías crónicas como las enfermedades inflamatorias y las enfermedades autoinmunes (6, 391, 407).

Los miembros de la familia IL-17, como IL-17A, IL-17C e IL-17F, regulan las funciones de las células epiteliales del colon en la EII y CAC. Se ha demostrado que IL-17A está elevada en las biopsias de tejido de pacientes con EII (6, 391, 407). IL-17A es el miembro más ampliamente estudiado de esta familia en el contexto de la EII y la tumorigénesis intestinal. IL-17A parece ser protector contra la colitis, mientras que favorece el desarrollo del cáncer de colon. Por ejemplo, el bloqueo de IL-17A fue ineficaz e incluso exacerbó la EII en algunos pacientes, debido al papel crítico que desempeña IL-17A en el mantenimiento de la homeostasis de la barrera epitelial (447). Por el contrario, la expresión de IL-17A

está elevada en CAC y CCR esporádico y empeora la progresión de la enfermedad (448, 449).

Aunque en general se acepta que las células Th17 son la fuente principal de IL-17A en el microambiente tumoral, los CTLs, las células T $\gamma\delta$ y las ILCs también son importantes productores de IL-17A (409). Las CDs que se infiltran en el tumor pueden promover la producción de IL-17 en células T $\gamma\delta$ a través de IL-23 y, de forma similar a los estudios en modelos de ratón, las células T $\gamma\delta$ intratumorales humanas promueven el reclutamiento y expansión de MDSCs (450, 451). Por lo tanto, IL-17A puede contribuir indirectamente al silenciamiento inmune en el microentorno tumoral. Además de las células hematopoyéticas, los CAFs también pueden expresar IL-17A en respuesta a quimioterapia en CCR humano y en modelos murinos de xenotransplante (452). La IL-17A puede actuar sobre las células del estroma tumoral, promoviendo la resistencia a terapias antiangiogénicas (453).

IL-22

La IL-22 es una citoquina de la familia IL-10 producida por ILCs del grupo 3, células Th17, células Th22 y posiblemente neutrófilos (454, 455). La IL-22 tiene un papel crucial en la resolución del daño tisular inducido por la lesión microbiana, las ROS y otros estímulos dañinos ya que aumenta la proliferación, la supervivencia y la regeneración de las IECs (454). Se cree que las acciones multifacéticas de la IL-22 preservan la integridad del epitelio intestinal al prevenir el daño tisular causado por la infección y la inflamación (456-458). Sin embargo, esta citoquina también puede promover colitis en algunos entornos al favorecer la secreción de otras citoquinas pro-inflamatorias y perpetuar la respuesta inflamatoria (454).

En humanos, se han asociado niveles séricos elevados de IL-22 con la resistencia a la quimioterapia en pacientes con CCR, resistencia mediada por la secreción autocrina de IL-8 dependiente de STAT3 (459). Kryczek et al recientemente demostraron que la IL-22 promueve CCR activando STAT3 (460).

IL-11

IL-11, un miembro de la familia IL-6 (383, 409), está implicada en la patogénesis del CCR. Se ha demostrado que tanto la IL-11 como su receptor están sobreexpresados en muestras de CCR (461, 462). Múltiples tipos de células sobreexpresan IL-11 durante el desarrollo de CCR, incluidas las células hematopoyéticas, los CAFs y también las células tumorales (461, 463). Se encontró que el efecto pro-tumorigénico de la IL-11 es más fuerte que el de la IL-6, tanto en los modelos de CAC como en los de CCR esporádicos (461). Esta citoquina media en la tumorigénesis intestinal dependiente de STAT3.

TGF- β

El TGF β es una citoquina compleja con importantes funciones en la homeostasis, la curación de heridas y el cáncer (383). La citoquina y sus receptores TGFBR1 y TGFBR2 se expresan comúnmente en células epiteliales (464), pero otras células en el microentorno del tumor, incluidos los CAFs, responden o secretan TGF- β (465).

TGF- β tiene una doble función durante la tumorigénesis intestinal. Generalmente se acepta que el TGF- β es un potente supresor de tumores, que induce la interrupción del ciclo celular en etapas tempranas del cáncer (466, 467). La frecuente aparición de mutaciones que inactivan componentes moleculares de la señalización de TGF- β en CCR corrobora la relevancia de esta citoquina en la patología (383, 409, 468).

A pesar de restringir la tumorigénesis en etapas tempranas, los niveles altos de TGF- β en el tumor primario o suero de pacientes, se asocian con un pronóstico desfavorable y disminución de la supervivencia, particularmente en pacientes con CCR localmente avanzado (383, 409, 463).

El TGF- β puede promover la secreción de IL-11 por los CAFs (463), lo que a su vez activa STAT3 e impulsa la proliferación de células tumorales y aumenta la metástasis en múltiples órganos (461, 463).

IL-10

La IL-10 desempeña un papel protector durante la inflamación intestinal (469). La citoquina inhibe la producción de IL-1 β , IL-6, TNF- α , y otras citoquinas

pro-inflamatorias en monocitos y macrófagos (470). Además, IL-10 disminuye la expresión de MHC II, así como de moléculas co-estimuladoras, como CD80 y CD86 en monocitos (471). Las mutaciones en el gen IL-10 se han relacionado con el desarrollo de la EII tanto en humanos como en ratones. Los seres humanos que tienen mutaciones que conllevan a la pérdida de función en los componentes genéticos de la vía de señalización de IL-10, desarrollan enterocolitis de inicio temprano e hiperinflamación en el colon (472, 473). La IL-10 también juega un papel protector en modelos animales de CCR. Los ratones deficientes en IL-10 desarrollan colitis espontánea en el colon, que depende de la presencia de una microflora específica (474-476).

En contraste, se ha encontrado, en muestras de pacientes, niveles séricos crecientes de IL-10 durante la progresión del CCR (409, 477). Además, los niveles séricos preoperatorios altos de IL-10 se correlacionaron con una mala supervivencia de los pacientes (478), lo que sugiere un papel promotor de tumores de la IL-10 en pacientes con CCR.

Varias células, incluidas las células T, los monocitos, los macrófagos y las IECs, producen IL-10 (409). Sin embargo, la IL-10 la producen principalmente las células Treg, que desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (479). La unión de IL-10 a su receptor activa STAT1, STAT3 y STAT5 (409, 480).

IL-6

La IL-6 es una citoquina inflamatoria claramente implicada en el desarrollo de CCR y CAC (481). La mayoría de los efectos de la IL-6 en las células cancerosas están mediados por el factor de transcripción STAT3 (482). La IL-6 es producida por varios tipos de células, por ejemplo, los monocitos, macrófagos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células B, células T y también varias células tumorales (483). Los monocitos y macrófagos parecen ser los principales productores de IL-6 durante la inflamación aguda y las células T durante la inflamación crónica (484). Las células T de la lámina propia, los TAMs, y CAFs también pueden secretar IL-6 en el estroma del CCR (395, 485, 486).

La señalización de IL-6 activa a las proteínas Janus quinasas (JAKs), con una posterior inducción de STAT3. También activa las vías oncogénicas Ras/MAPK y PI3K/Akt (482). Como ya se mencionó, la activación de STAT3 es un paso importante para la promoción y la progresión del CCR, induciendo la expresión de varios genes diana involucrados en la supervivencia, proliferación, angiogénesis, metástasis, adhesión celular, resistencia a drogas e inflamación (392, 424, 487) (Figura 1.13). Esta citoquina además, promueve directamente la acumulación de MDSCs en los tumores, lo que facilita la progresión del tumor (409, 488).

También se ha demostrado que la IL-6 regula de forma negativa el gen supresor tumoral p53 en las células epiteliales del colon, lo que favorece la EMT y la resistencia a la apoptosis (489). Se ha descrito que la IL-6 también provoca inactivación o represión de los genes MMR, por tanto induce daño en el DNA (490).

Niveles elevados de IL-6 en suero se han correlacionado con el aumento del tamaño tumoral, la aparición de metástasis hepáticas y una supervivencia reducida en pacientes con CCR (409). Debido a la correlación entre la expresión de IL-6 con el pronóstico de CCR y al aumento de la expresión de IL-6 en pacientes con EII, se piensa que la IL-6 actúa como un vínculo entre la inflamación crónica y el desarrollo del tumor.

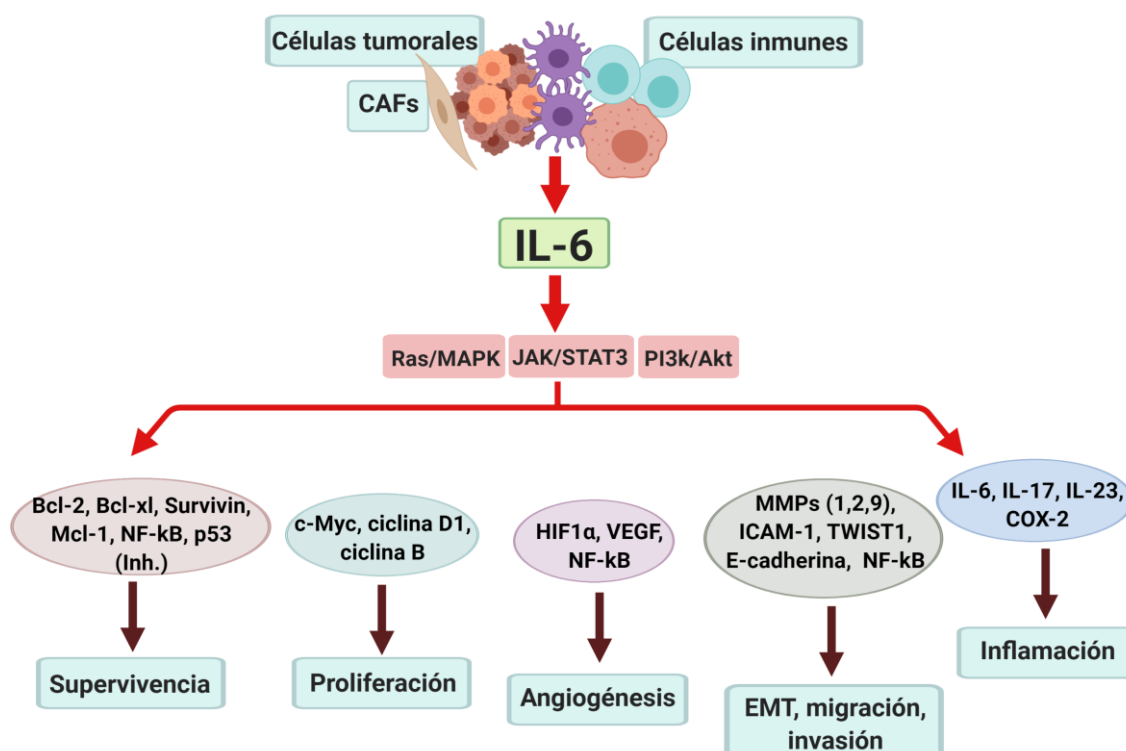


Figura 1.13 Papel de la IL-6 en CCR. IL-6 activa las vías JAK/STAT-3, Ras/MAPK y PI3K/AKT, induciendo la modificación de la expresión de varios genes que afectan la proliferación celular, la supervivencia, la migración, la invasión, la angiogénesis e inflamación.

1.4.5.6 La vía COX-2/PGE2: inflamación y tumorigénesis colorrectal

La expresión aberrante COX-2, que ocurre en la mayoría de los tumores colorrectales, desempeña un papel crucial durante desarrollo del CCR (6, 491-493). La desregulación de la expresión de COX-2 conduce a la sobreexpresión de su principal producto metabólico, la PGE2, cuyos efectos pleiotrópicos parecen mediar en la mayoría de las características distintivas del cáncer (6, 494-496). Se han encontrado niveles elevados de PGE2, tanto en adenomas como en carcinomas colorrectales humanos (494). También se ha descrito que los niveles de PGE2 aumentan de forma dependiente al tamaño de los adenomas de pacientes con FAP (495), así como en los adenomas de ratones ApcMin+ (6).

Los mecanismos protumorigénicos de la vía COX-2/PGE2 incluyen la inhibición de la apoptosis, al aumentar la expresión de Bcl-2 a través de las vías de señalización MAPK o PI3K/AKT (6). La PGE2 también activa la señalización

dependiente de β -catenina, lo que promueve la supervivencia y proliferación (497). La vía COX-2/PGE-2, además, puede estimular la angiogénesis tumoral mediante la inducción de la producción de VEGF y el factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFCF) (498), y además aumenta la migración y la invasión tumoral al alterar las propiedades adhesivas de las células y la actividad de las MMPs (499). En las células mieloides, la señalización de PGE2 reduce la expresión de la citoquina antitumorigénica IL-12 y aumenta la expresión de la citoquina protumorigénica IL-23 (500).

1.4.6 Células del sistema inmunitario en CCR

Al igual que otras neoplasias malignas sólidas, los tumores colorrectales están infiltrados por varios tipos de células inmunitarias.

El desarrollo y la progresión de los tumores colorrectales, están determinados de manera crucial por el microambiente del tumor, incluidos los componentes celulares (por ejemplo fibroblastos, células del sistema inmunitario y células endoteliales), la microbiota intestinal y los factores no celulares (matriz extracelular, citoquinas y factores de crecimiento) (501-503). Todos estos componentes interactúan constantemente entre sí, lo que influye en el desarrollo del tumor.

Las células del sistema inmunitario innato, como los neutrófilos, las células NK, las células linfoides innatas (ILCs, del inglés “Innate Lymphoid Cells”), los mastocitos, las CDs y los TAMs pueden detectarse fácilmente en estos tumores (504).

Además, los tumores avanzados reclutan subconjuntos mieloides específicos que representan una población fenotípicamente heterogénea, pero funcionalmente similar, de células CD11b+Gr1+, son las llamadas MDSCs (505). Estas células comparten algunas características con monocitos, macrófagos, neutrófilos y CDs y facilitan la supresión de las respuestas inmunitarias antitumorales y la angiogénesis tumoral (505).

En resumen, durante el CCR, la inmunovigilancia (ejecutada por las células T CD8+, las células NK y las células T CD4+) podría mediar la detección

temprana y la eliminación de células transformadas y focos de cripta aberrantes, y también mantener pequeños tumores en estado latente. La inmunovigilancia también puede ser importante durante la metástasis, cuando un número pequeño de células metastásicas viajan y pueden ser atacadas por células inmunitarias antitumorales. En muchas otras etapas de la tumorigénesis colorrectal, la inflamación protumorigénica (ejecutada por las células inmunitarias innatas, las células B y varios subtipos de células T), contrarresta y supera la inmunidad antitumoral mediante efectos inmunosupresores directos, así como mediante la regulación de la supervivencia, proliferación y angiogénesis de células tumorales [revisado en (6)].

En la tabla 1.11 se muestran las funciones de las diferentes subpoblaciones del sistema inmunitario en el microambiente tumoral.

Grupo Celular	Funciones antitumorales	Funciones protumorales
Macrófagos	Eliminación de células tumorales. Producción de citoquinas (506, 507).	Inmunosupresión. Producción de citoquinas, quimioquinas, MMPs y factores angiogénicos (508-510).
Linfocitos T CD8 ⁺	Eliminación de células tumorales. Producción de citoquinas (503, 511, 512).	Producción de citoquinas (513).
Linfocitos T CD4 ⁺ Th1	Producción de citoquinas (503).	Producción de citoquinas (503).
Linfocitos T CD4 ⁺ Th2		Producción de citoquinas. Polarización de macrófagos a fenotipo M2. Activación de células B (514, 515).
Linfocitos T CD4 ⁺ Th17	Activación de linfocitos T CD8 ⁺ (516).	Producción de citoquinas (IL-17) (517, 518).
Linfocitos Treg	Supresión de inflamación protumorigénica (516, 519).	Inmunosupresión. Producción de citoquinas (IL-10, TGF- β) (520, 521).
Linfocitos T $\gamma\delta$	Citotoxicidad de células tumorales (Perf, GzmB, ADCC). Producción de citoquinas (IFN- γ , TNF- α). Producción de anticuerpos. Presentación de antígenos a linfocitos T $\alpha\beta$. Maduración CDs. Activación de células NK (522, 523).	Producción de citoquinas (IL-17, TGF- β , IL-10, IL-4). Reclutamiento de MDSCs. Favorecen las funciones inmunosupresoras de neutrófilos. Inhiben funciones antitumorales de linfocitos T $\alpha\beta$ y CDs (522, 523).

Grupo Celular	Funciones antitumorales	Funciones protumorales
CDs	Presentación antigénica a linfocitos T. Activación de células T CD8 ⁺ . Diferenciación de células Th1 (IL-12) (524, 525).	Señales inhibitorias de linfocitos T (PD-L1, PD-L2). Diferenciación de células Th2, células Th17 y células Treg (524, 526).
Células Inmunosupresoras de origen mieloide (MDSC)		Disminución de la proliferación de linfocitos T. Inducción de apoptosis de linfocitos T y células NK. Producción de IL-10 y TGF- β . Producción de MMPs y factores angiogénicos (505).
Neutrófilos	Neutrófilos proinflamatorios N1. Eliminación de células tumorales. Producción de ROS, TNF- α , IL-12, CCL3. Reclutamiento y activación de células T CD8 ⁺ (527, 528).	Neutrófilos antiinflamatorios N2. Producción de ROS. Quimiotaxis de células Th2 y células Treg (529-531).
Células B	Producción de anticuerpos antitumorales. Producción de IFN- γ o IL-12. Citotoxicidad directa (516, 532).	Producción de IL-10, TGF- β . Reclutamiento de MDSCs. Polarización a macrófagos de fenotipo M2. Diferenciación de células Treg (533).
Células NK	Eliminación de células tumorales (Perf, GzmB, FasL, TRAIL). Producción de citoquinas (IFN- γ y TNF- α). Quimiotaxis de CDs (CCL5 y CXCL1) (534-536).	
Células NKT	Producción de citoquinas. Activación de células T CD8 ⁺ (537, 538).	Producción de citoquinas. Polarización de macrófagos a fenotipo M2. Aumento de la proporción y actividad de células Treg (538, 539).
ILCs	Eliminación de células tumorales. Producción de citoquinas (IFN- γ y TNF- α) (540)	Producción de citoquinas. Producción de Areg Polarización de macrófagos a fenotipo M2. Reclutamiento de MDSCs (540, 541).

Tabla 1.11 Papel de las diferentes subpoblaciones del sistema inmunitario en la inmunidad antitumoral y en la inflamación que favorece CCR. Areg: anfirregulina, ADCC: citotoxicidad mediada por anticuerpos (del inglés, "Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity").

1.4.7 Papel de la microbiota intestinal en el desarrollo del cáncer

En el intestino humano hay 500 tipos diferentes de microorganismos y el colon contiene más de 10^{13} células bacterianas (542). La microflora intestinal tiene importantes funciones inmunitarias, metabólicas y homeostáticas, afecta la proliferación y supervivencia de las células epiteliales y proporciona protección contra los patógenos (543). La microbiota intestinal metaboliza los carbohidratos no absorbidos, las células epiteliales muertas y el moco. También produce metabolitos que influyen en la función de las células epiteliales, el balance de energía y las respuestas inmunitarias (544, 545). Además produce vitaminas, ácidos grasos de cadena corta que regulan la respuesta inflamatoria en EII y metaboliza los ácidos biliares (546).

Los estudios han demostrado que el desarrollo de CAC depende cualitativa y cuantitativamente de la microflora intestinal (547-549). La interrupción de la homeostasis de la microflora intestinal podría promover el cáncer de varias maneras. Los patógenos microbianos pueden causar inflamación intestinal a través de la activación de PRRs o por endocitosis, también por adherencia y secreción de toxinas o invasión (550). La inflamación intestinal puede ser el resultado de un equilibrio aberrante entre la microflora protectora (tolerogénica) y microflora agresiva (proinflamatoria, inductora de daño, protumorigénica). Los cambios en el número, la diversidad y la estabilidad de las bacterias comensales (disbiosis), particularmente *Clostridia spp*, pueden alterar los procesos fisiológicos normales y provocar enfermedades, incluido CCR (551); así que, la cantidad y calidad de la microbiota gastrointestinal afecta el desarrollo de CAC (548). La especie *Bacteroides fragilis* enterotoxigénica puede promover la tumorigénesis del colon, si es capaz de inducir daño tisular y colitis, con la activación posterior de STAT3 y la producción de IL-17 (552). Es posible que solo las bacterias que inducen una combinación de lesión tisular e inflamación promuevan el cáncer, mientras que la inflamación sin ciclos continuos de lesión y reparación es insuficiente para la inducción tumoral. Otros patógenos o comensales condicionales también contribuyen a la tumorigénesis, por ejemplo, la especie *Enterococcus faecalis* puede promover la producción de ROS. En el caso de *Streptococcus bovis*, *Bacteroides fragilis* y otras bacterias producen

citoquinas que favorecen supervivencia y angiogénesis (IL-6, IL-8, IL-17) (553). Asimismo, se ha encontrado, en muestras de tumores colorrectales y en tejidos adyacentes a tumores, la acumulación de muchas especies bacterianas (547).

En la tabla 1.12 se muestra un resumen de los microorganismos relacionados con el CCR y la EII.

Microorganismo	Mecanismo patológico
En CCR	
<i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxigénica	Activación de STAT3. Lesiones en la estructura y función de IECs. Producción de IL-17. Activación de NF-κB y Wnt.
<i>Bacteroides vulgates</i>	Señalización dependiente de MyD88. Activación de NF-κB.
<i>Bifidobacterium longum</i> <i>Clostridium butyricum</i> <i>Mitsuokella multiacida</i>	Aumento de presencia bacteriana en tumores colorrectales y en tejidos adyacentes a tumores.
<i>Escherichia coli</i> productora de colibactina	Producen el metabolito carcinogénico colibactina. Colonización intracelular.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Producción de ROS y daño en el DNA.
<i>Streptococcus bovis</i>	Producción de IL-8. Formación de criptas aberrantes. Aumento de la proliferación de IECs.
<i>Fusobacterium Nucleatum</i>	Aumento de presencia e invasividad bacteriana en tumores colorrectales. Lesiones en la estructura y función de IECs. Activación de Wnt. Daños en DNA, MSI. Inhibición de la acción citolítica de las células NKs.
Condición: libre de gérmenes	Resistencia al cáncer de colon.
En EII	
<i>Bacteroides fragilis</i>	Estimulación de la producción de IL-17.
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Cambios de glucosilación (adhesión defectuosa y migración)
<i>Clostridium difficile</i>	Aumento de presencia bacteriana en el tejido.
<i>Clostridium leptum</i> y <i>coccoides</i>	Alteración de la diversidad de la microbiota con cambio a potencial proinflamatorio/pro-tumorigénico.
<i>Escherichia coli</i> invasiva	Colonización de IECs. Producción de IL-8, IFN-γ, TNF-α y de la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 6 (CEACAM6).

Tabla 1.12 Microorganismos relacionados con el CCR y EII. Adaptado de (6).

1.4.8 Modelos experimentales para el estudio de CCR

Existen varios modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para el estudio del CCR. Estos han proporcionado herramientas importantes para investigar el desarrollo y la patogénesis, los mecanismos etiológicos y fisiopatológicos, así como el tratamiento del CCR humano.

1.4.8.1 Modelos *in vivo*

El estudio de la carcinogénesis de colon en roedores tiene una larga historia, que se remonta a casi 80 años (554).

Estos modelos ofrecen muchas ventajas: son altamente reproducibles, son útiles para estudiar la influencia de factores genéticos y ambientales que influyen en el desarrollo del CCR y, además, recapitulan la patogénesis del CCR humano, al menos en las primeras etapas (555). Los modelos murinos para estudiar la patogénesis del CCR son relevantes dada la alta frecuencia de tumores generados en la porción distal del colon de ratones, así como la histogénesis de múltiples adenomas con el posterior desarrollo de adenocarcinomas (556). Otra gran ventaja de los modelos murinos es la disponibilidad de información genética extensa sobre líneas individuales de ratones, la existencia de paneles de ratones endogámicos recombinantes y el número cada vez mayor de modelos genéticos transgénicos, knockout y knockin, disponibles (557). Una desventaja notable de estos modelos es la falta general de fenotipo invasivo y metastásico (558). Recientemente, se ha desarrollado un modelo de CCR en ratones transgénicos, con mutaciones en cuatro genes implicados en CRC humano: APC, K-ras, TGFBR2 y p53. Estos ratones desarrollaron tumores intestinales metastásicos, con características de los CCR MSS humanos, incluida la baja carga mutacional, invasión estromal y activación de TGF- β (468).

Se han desarrollado muchos modelos *in vivo* para estudiar el CCR:

- Animales genéticamente modificados
- Modelos de xenotransplantes
- Modelos químicamente inducidos

Modelos inducidos por agentes químicos

En la tabla 1.13 se muestran los carcinogénicos usados para inducir CCR.

Grupo	Carcinogénico
Aminas heterocíclicas	2-amino-3-metilimidazol [4,5-f] quinolina (IQ)
	2-amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-b] piridina (PhIP)
Aminas aromáticas	3,2'-dimetil-4-aminobifenilo (DMBA)
Compuestos de alquilnitrosamida	metilnitrosourea (MNU)
	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG)
Dimetilhidrazina y metabolitos	1,2-dimetilhidrazina (DMH)
	Azoximetano (AOM)

Tabla 1.13 Carcinogénicos usados en modelos experimentales para inducir CCR.

1.4.8.2 AOM

El AOM es el carcinogénico más utilizado para inducir, y así estudiar, el CCR esporádico. Este modelo aprovecha el organotropismo o afinidad química que tiene AOM por el colon.

El AOM es un metabolito de la DMH, y es precursor del carcinógeno metilazoximetanol (MAM). Ambos se han utilizado para inducir CCR en ratones y ratas (558). Tanto DMH como AOM requieren varios pasos de activación metabólica para inducir aductos reactivos con el DNA. La hidroxilación de AOM da como resultado la formación del metabolito reactivo MAM, un ion metildiazonio, que puede alquilar macromoléculas en el hígado y el colon, incluida la adición de grupos metilo en la posición O6 o N7 de la guanina (O6-metil-deoxiguanosina y N7-metil-deoxiguanosina) en la molécula de DNA. La metilación en la posición O6 de la guanina ha demostrado ser la principal lesión promutagénica producida por el AOM (559).

Los tumores inducidos por AOM comparten muchas de las características histopatológicas del CCR humano. Con frecuencia tienen mutaciones en KRAS y β -catenina, algunos muestran MIS, lo que indica un sistema de reparación de desajuste defectuoso (560, 561). Sin embargo, las mutaciones de APC son

menos frecuentes en roedores y rara vez se observan mutaciones de p53 (558, 562). La tendencia a hacer metástasis es baja (563).

1.4.8.3 Modelo de CAC. DSS/AOM

Varios trabajos han confirmado la relevancia del modelo DSS (Sulfato de Dextrano Sódico)/AOM en el estudio de los mecanismos de la carcinogénesis colorrectal humana. Se ha demostrado que, debido a los efectos sinérgicos entre AOM y DSS, se acorta considerablemente el tiempo de latencia en comparación con el modelo clásico de CCR espontáneo, que se basa en inyecciones repetidas de AOM, o en comparación con los modelos basados únicamente en la administración de DSS a diferentes dosis y pautas. El tratamiento con DSS/AOM reproduce la carcinogénesis colorrectal promovida por una fase inicial de inflamación aguda, causando un rápido crecimiento de múltiples tumores de colon en 8-10 semanas, mientras que en los otros modelos hay un tiempo de latencia de aproximadamente 30 semanas (564). El modelo DSS/AOM es particularmente útil cuando se estudia la iniciación y progresión de CAC. El uso de DSS en combinación con AOM da como resultado una incidencia del 80-100 % de tumores en el colon de cepas sensibles en comparación con el 15–20 % cuando se administra DSS solo (558). Los tumores son muy frecuentes en la parte distal del colon, que también es la ubicación predominante del CCR humano. A menudo comienzan con un crecimiento polipoide y presentan características histopatológicas similares al CCR humano (558, 562).

Vías genéticas involucradas en el modelo DSS/AOM

Las evidencias muestran características muy similares entre el CCR humano y el inducido en roedores por DSS/AOM, también a nivel molecular. Dichos tumores presentan desregulación de la vía de señalización de APC/ β -catenina, como por ejemplo la expresión aberrante de APC, además de mutaciones y la localización celular alterada de β -catenina (565-567). También se ha demostrado que están desregulados genes diana de la vía de señalización de APC/ β -catenina, como el oncogén cMyc, ciclina D1 y quinasa dependiente de ciclina 4 (Cdk4) (567). En concordancia con los hallazgos encontrados en el CCR humano, los tumores inducidos por DSS/AOM también tienen mutaciones

de KRAS y mayores niveles de las enzimas, COX2 y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (560, 566).

Las alteraciones genéticas en el gen p53, tan comúnmente encontradas en el CCR humano, no se observan en el modelo de CAC inducido con DSS/AOM (558, 562, 568, 569). El gen p53 permanece sin mutar, a pesar de que los animales p53^{-/-} desarrollan más tumores si son tratados con AOM (570).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La inflamación es un mecanismo clave que regula la actividad del sistema inmune en situaciones fisiológicas, por ejemplo, durante la eliminación de tumores y agentes patógenos. Sin embargo, la inflamación crónica también regula respuestas fisiopatológicas durante las enfermedades infecciosas, autoinmunes, así como en la génesis y progresión del cáncer (4-6, 193, 571, 572).

Se ha realizado un gran esfuerzo para comprender las vías y mecanismos moleculares que regulan la respuesta inflamatoria y los elementos clave de esta. Varios estudios han permitido concluir que, tanto la respuesta inflamatoria inmune, que conducen a la eliminación de patógenos y tumores, como los trastornos inflamatorios crónicos, que conducen al desarrollo de enfermedades, comparten los mismo mecanismos (7-11). Esta dualidad ha dificultado el tratamiento de los trastornos asociados a inflamación crónica sin predisponer a la aparición de efectos secundarios graves. En la mayoría de las terapias se han utilizado compuestos inmunosupresores de amplio espectro como esteroides o agentes que bloquean la función de las citoquinas, incluidos los antagonistas de los receptores IL-1 β , IL-6 y TNF- α , o anticuerpos bloqueantes (7, 573-576) y como era de esperar, los efectos secundarios de estos compuestos pueden ser graves, especialmente, los pacientes presentan un alto riesgo de infección con patógenos que incluyen tuberculosis (577) y probablemente linfoma y melanoma (578).

Las células citotóxicas (células NK y linfocitos T citotóxicos) son esenciales para la defensa del huésped contra patógenos y tumores, siendo responsables de la eliminación de las células afectadas, pero también pueden estar implicadas en el daño asociado a inflamación crónica porque producen cantidades significativas de citoquinas proinflamatorias y también son capaces de regular su producción por otros grupos celulares (12, 13).

Uno de los mecanismos que utilizan estas células para ejercer sus efectos citotóxicos es la exocitosis granular. Este es un proceso de interacción funcional entre la Perf (citolisina formadora de poros) y las Gzms, una familia de serina

proteasas contenidas dentro de los gránulos citoplasmáticos de las células citotóxicas (15). La Perf actúa permitiendo el paso de Gzms al interior de la célula diana, donde estas ejercen sus acciones fisiológicas, por ejemplo la apoptosis (30, 31, 34). Algunas Gzms también se liberan al medio extracelular (65, 76), donde pueden estar involucradas en procesos inflamatorios (80, 84, 86, 114), la remodelación de la matriz extracelular (79, 82), la aterosclerosis (108), el envejecimiento cutáneo (106) y cicatrización de la piel (78).

Las granzimas A y B (GzmA y GzmB) son las Gzms más abundantes y mejor estudiadas (13, 82). Además, se han descrito otras Gzms menos abundantes, denominadas Gzms huérfanas, cuyas funciones biológicas están en estudio (61). Tradicionalmente, se ha pensado que las Gzms ejercen sus efectos biológicos eliminando a las células afectadas. En la actualidad, ha quedado bien esclarecido que la GzmB es eminentemente citotóxica y, junto con la Perf, induce la apoptosis en células infectadas por virus y células transformadas (13, 579). Sin embargo, evidencias experimentales muy recientes, *in vitro* e *in vivo*, indican que otros miembros de esta familia no presentan efectos citotóxicos (73, 74, 128, 149, 152).

Recientemente, varios grupos de investigación, incluido el nuestro, han destacado la capacidad de algunas Gzms, especialmente la GzmA, para actuar como un mediador proinflamatorio.

Se ha confirmado que la GzmA es capaz de inducir una respuesta inflamatoria en diferentes tipos celulares como monocitos y macrófagos (133, 144), células epiteliales o fibroblastos (145), contribuyendo a la generación de citoquinas pro-inflamatorias por parte de estos tipos celulares. En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha podido constatar que la GzmA no es citotóxica, sino que induce una respuesta pro-inflamatoria en los macrófagos mediante la inducción de la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α (13, 133, 580). El déficit de GzmA ha demostrado ser un factor protector frente a la endotoxemia inducida por LPS (133, 149) y la sepsis bacteriana inducida por *B. Microti* (150), sin comprometer la eliminación bacteriana. Esta protección se correlacionó con una disminución en el nivel de diversas citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-17) en ratones deficientes en GzmA. Por otro lado, se ha encontrado aumento de las

cantidades de GzmA, así como de células que expresan la proteasa infiltrando diferentes tejidos, en varias enfermedades inflamatorias/autoinmunes como el síndrome de Sjogren (581), sepsis (582), liquen plano oral (583), esclerosis lateral amiotrófica (584) enfermedad de Behcet (585) o asma (586).

De igual forma, se han encontrado niveles elevados de GzmA en el plasma y en el líquido sinovial de pacientes con AR (111, 146), lo que sugiere que la GzmA puede estar implicada en la fisiopatología de la enfermedad. Más recientemente, se constató que los ratones deficientes en GzmA estaban protegidos contra la artritis inducida por el virus Chikungunya (587).

Por otro lado, la GzmA pudiera estar implicada en la iniciación y desarrollo de CCR de origen inflamatorio. Hay varias evidencias que soportan esta hipótesis, por ejemplo, se han detectado niveles elevados de linfocitos infiltrantes que expresan GzmA en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (154). También se demostró, que el mRNA de GZMA estaba incrementado en biopsias intestinales de pacientes con UC (155). Recientemente se confirmó que la expresión de GzmA en subconjuntos específicos de células T CD4⁺ se correlacionaba con la eficacia frente a Etrolizumab, un anticuerpo monoclonal anti- $\beta 7$ integrina (156).

Teniendo en cuenta el hecho de que la inflamación controla un gran número de procesos patológicos, incluidos enfermedades autoinmunes como la AR y las diferentes etapas de los procesos carcinogénicos, como el CCR. Por otro lado, considerando todos los antecedentes anteriormente expuestos, que sugieren que la GzmA podría tener función pro-inflamatoria, en el presente trabajo nos planteamos la **hipótesis** de que la inflamación inducida por la GzmA tiene un papel relevante en la AR y el CCR asociado a colitis. En consecuencia, la inhibición selectiva de la GzmA podría ser utilizada como diana terapéutica para reducir la inflamación y por tanto tratar la AR y el CCR, manteniendo intacta la respuesta inflamatoria protectora y evitando la aparición de reacciones adversas graves asociadas a los tratamientos inmunosupresores actuales.

Objetivos

El objetivo de esta tesis ha sido establecer la relevancia biológica de la inflamación inducida por la GzmA *in vivo*, durante la AR inducida con colágeno o el CAC inducido con DSS/AOM.

Por ello, se han planteado los siguientes objetivos intermedios:

1. Analizar *in vivo* la implicación de la inflamación inducida por la GzmA en el modelo CIA.
 - 1.1. Comparar la severidad de la enfermedad y el daño histológico entre ratones wt, Perf^{-/-} y GzmA^{-/-} durante la AR inducida por colágeno.
 - 1.2. Determinar los niveles de citoquinas proinflamatorias durante la AR inducida por colágeno.
 - 1.3. Determinar los niveles extracelulares de GzmA en el lisado de proteínas totales de las articulaciones y en el suero de ratones wt con CIA.
 - 1.4. Examinar la respuesta de células B, *in vivo*, detectando la generación de anticuerpos específicos contra el colágeno tipo II.
 - 1.5. Comparar la respuesta de células T reactivas, *in vitro*, frente al colágeno tipo II.
2. Analizar el efecto de la GzmA en la diferenciación de OCs *in vivo*.
 - 2.1. Comparar la expresión del receptor de calcitonina en tinciones inmunohistoquímicas de secciones de tejido de articulaciones de ratones wt y GzmA^{-/-} con CIA.
 - 2.2. Analizar la expresión génica de marcadores específicos de OCs, en ratones wt y ratones GzmA^{-/-}, durante CIA.
 - 2.3. Determinar los niveles en suero del biomarcador telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (ICTP), en ratones wt y GzmA^{-/-} con CIA.
3. Determinar el mecanismo a través del cual la GzmA induce la formación de OCs.
 - 3.1. Demostrar la capacidad osteoclastogénica de la GzmA *in vitro*.

- 3.2. Analizar *in vitro* el papel del TNF- α en la osteoclastogénesis mediada por GzmA.
4. Determinar la expresión génica, así como los niveles y la actividad específica de GzmA en el cultivo *ex vivo* de tejido de colon de ratones wt durante la UC inducida por DSS y el CAC inducido por DSS/AOM.
5. Analizar la implicación de la inflamación promovida por la GzmA en la UC, aguda y crónica, inducida por DSS.
 - 5.1. Comparar la severidad de la enfermedad y la supervivencia de ratones wt y GzmA^{-/-} durante la UC inducida por DSS.
 - 5.2. Evaluar el daño a nivel macroscópico e histológico durante UC.
 - 5.3. Determinar los niveles de citoquinas proinflamatorias *ex vivo* durante la UC inducida por DSS.
6. Analizar *in vivo* la implicación de la inflamación inducida por la GzmA en el CAC inducido por DSS/AOM.
 - 6.1. Identificar los principales grupos celulares que expresan GzmA durante CAC inducido por DSS/AOM.
 - 6.2. Comparar la severidad de la enfermedad y la supervivencia de ratones wt y GzmA^{-/-} durante CAC inducido por DSS/AOM.
 - 6.3. Evaluar el daño a nivel macroscópico, así como la incidencia, el número y el diámetro de los tumores durante el tratamiento con DSS/AOM
 - 6.4. Determinar el daño histológico y el grado tumoral en ratones wt y GzmA^{-/-} con CAC.
 - 6.5. Analizar el efecto de la deficiencia de GzmA en la EMT y la proliferación tumoral.
 - 6.6. Determinar los niveles de citoquinas proinflamatorias y de PGE2, así como de la expresión génica de COX-2, *ex vivo*, durante CAC inducido por DSS/AOM.

- 6.7. Comparar la composición de la microbiota, la permeabilidad intestinal y los niveles de citoquinas proinflamatorias en ratones wt y deficientes en GzmA en condiciones basales.
- 6.8. Analizar *in vivo* los efectos de la inhibición de las citoquinas IL-6 y TNF- α durante el CAC inducido por DSS/AOM.
- 6.9. Analizar *in vivo* el papel de la inhibición terapéutica de GzmA, con el inhibidor específico serpinb6b, durante el CAC inducido por DSS/AOM.
7. Analizar *in vitro* el papel de IL-6, producida por macrófagos estimulados con GzmA, en la activación de las vías carcinogénicas STAT3 y NF-kB, en la línea de CCR MC-38.
8. Examinar la correlación entre expresión de GZMA e inflamación en muestras humanas de CCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Experimentos *in vivo*

3.1.1 Ratones

En los experimentos *in vivo* se siguieron los protocolos de experimentación animal aprobados por el comité de ética del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). Los experimentos de artritis inducida por colágeno (CIA) se realizaron según el procedimiento de experimentación PI 33/13, mientras que los de colitis y CCR asociado a colitis (CAC) se realizaron según el procedimiento de experimentación PI 17/15.

En todos los experimentos de CIA se usaron ratones hembra. Para los experimentos de colitis y CAC se usaron ratones macho. En ambos modelos de experimentación animal se usaron ratones de entre 8 y 12 semanas de edad.

Los animales utilizados en los diferentes ensayos fueron los siguientes:

1. Animales control (wild type -wt-)

- C57BL/6 (B6) procedentes de los laboratorios Janvier, o de la colonia estable criada y mantenida en el animalario del CIBA.

2. Animales Knock-out (KO): en los experimentos se utilizaron ratones C57BL/6 deficientes en algunas proteínas del sistema inmune implicadas en el mecanismo de exocitosis granular.

- Ratones deficientes en granzima A ($Gzma^{-/-}$), granzima B ($Gzmb^{-/-}$) o perforina ($Perf^{-/-}$). Estos animales fueron amablemente proporcionados por el Dr. Markus Simon del Instituto Max-Planck de Inmunobiología y Epigenética, Friburgo, Alemania y mantenidos en el animalario del CIBA.

Los animales fueron criados y mantenidos en ambiente libre de patógenos, con alimentación y agua a libre demanda.

3.1.1.1 Determinación del genotipo de los ratones

Para comprobar el genotipo de los ratones utilizados en los experimentos, se realizó PCR del DNA obtenido de la cola (siempre después del sacrificio del

animal) o de los dedos (antes del destete, aprovechando el tejido que se retira para identificar a los ratones).

Para obtener el DNA se siguió el siguiente protocolo: se introdujo el fragmento de tejido seccionado en un tubo de 1,5 ml y se añadieron 50 µl de una solución 25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA. La mezcla se incubó 1 h a 95 °C y posteriormente se enfrió 15 min a 4 °C. Luego se añadieron otros 50 µl de una solución 40 mM Tris-HCl para neutralizar el NaOH. Por último se eliminaron los restos de tejido residuales y el sobrenadante se utilizó para la PCR o se guardó a -20 °C.

La amplificación del DNA se llevó a cabo en diferentes mezclas utilizando en cada caso los cebadores adecuados para detectar los genes correspondientes a cada proteína. Las secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores de la reacción (588), así como el protocolo utilizado para realizar la PCR fueron:

Proteína	Cebador	Secuencia
GzmA	O1 Neo2A	5'-CGG AGA ACC TGC GTG CAA TC-3'
	HF-I1	5'-AGG AGC AAT ATA TAC CAA TGG-3'
	HF-7AS	5'-AGG TAG GTG AAG GAT AGC CAC-3'
GzmB	Neo2S	5'-TTC CTC GTG CTT TAC GGT ATC-3'
	ST-1S	5'-CTG CTA CTG CTG ACC TTG TCT-3'
	ST-1AS	5'-TGA GGA CAG CAA TTC CAT CTA-3'
Perf	O1Neo2A	5'-CGG AGA ACC TGC GTG CAA TC-3'
	JT98	5'-CCA CTC CAC CTT GAC TTC AAA AAG GCG-3'
	JT272	5'-TGG GCA GCA GTC CTG GTT GGT GAC CTT-3'

Tabla 3.1 Secuencias de los cebadores utilizados para la PCR de genotipado.

Mezcla de reacción (volumen total 25 µL)		
SuperHotMaster Mix 2X (BIORON)	12,5 µL	
Agua para PCR	9.5 µL	
GzmA	O1 Neo2A	0.75 µL (0.3 µM)
	HF-I1	0.75 µL (0.3 µM)
	HF-7AS	1.5 µL (0.6 µM)
GzmB	Neo2S	0.75 µL (0.3 µM)
	ST-1S	0.75 µL (0.3 µM)
	ST-1AS	1.5 µL (0.6 µM)
Perf	O1Neo2A	0.75 µL (0.3 µM)
	JT98	0.75 µL (0.3 µM)
	JT272	1.5 µL (0.6 µM)

Tabla 3.2 Mezcla de la reacción de la PCR de genotipado.

Se añadió 1 µl del DNA obtenido, previamente extraído del tejido, a 25 µl de esta mezcla de reacción. Se llevó a cabo la PCR utilizando el siguiente programa:

Condiciones de la reacción		
Calentamiento inicial	94 °C	2 min
Desnaturalización	94 °C	10 seg
Hibridación	55 °C	20 seg
Extensión	72 °C	60 seg
Extensión	72 °C	5 min

Tabla 3.3 Condiciones de la reacción de la PCR de genotipado.

Los productos de amplificación obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE (0,045 M Tris-borato, 1 mM EDTA) que contenía dsGreen Gel Staining Solution, 10.000x (Lumiprobe), que se une específicamente al DNA, facilitando la visualización de las bandas del DNA amplificado. Como marcador de peso molecular se utilizó 100 bp DNA ladder (IBIAN). La visualización se llevó a cabo en el transiluminador Gel Doc 2000 de BioRad Laboratories (Hércules, CA). La determinación del genotipo de cada ratón se llevó a cabo de la siguiente manera:

Proteína	Genotipo +/+ (bp)	Genotipo -/- (bp)
GzmA	450	320
GzmB	360	430
Perf	660	950

Tabla 3.4 Tamaño de los productos de amplificación de la PCR de genotipado.

3.1.2 Artritis inducida por colágeno (CIA)

La artritis se indujo utilizando colágeno de pollo tipo II (Chondrex) en adyuvante completo de Freund (CFA) (Chondrex). A los 21 días de la primera inmunización los ratones fueron reexpuestos al colágeno, siguiendo el mismo procedimiento, pero esta vez usando adyuvante incompleto de Freund (IFA) (Chondrex). A continuación se detalla la preparación de la emulsión de colágeno y el proceso inmunización:

3.1.2.1 Preparación de la emulsión

Se añadió el volumen de CFA (o IFA en el caso de la 2ª inmunización) necesario, en dependencia del número de animales a inmunizar, en un recipiente de vidrio limpio y seco, previamente enfriado en hielo. Se añadió con micropipeta, poco a poco, colágeno de pollo tipo II y se resuspendió tras cada adición para que al mezclar se fuera formando la emulsión. Cuando todo el volumen de colágeno de pollo tipo II había sido añadido se resuspendió de manera continua hasta que se terminó de formar la emulsión. Se comprobó la estabilidad de la emulsión formada añadiendo una gota de la misma a un poco de agua, al no deshacerse se consideró que la emulsión era estable.

Durante todo el proceso los reactivos y la emulsión se mantuvieron en hielo para evitar la desnaturalización del colágeno de pollo tipo II.

3.1.2.2 Inmunización

Se inyectaron lentamente 100 µl de la emulsión a cada ratón, a 1,5 cm de la base de la cola, por vía intradérmica. Cuando la inoculación era correcta había resistencia del tejido a la inyección sino, era indicativo de una inyección subcutánea o profunda.

El día 21 después de la inmunización primaria se realizó una segunda inmunización en la que se usó la misma concentración de colágeno de pollo tipo II, sin embargo, en esta ocasión el colágeno de pollo tipo II se emulsionó en IFA (el uso de CFA en la inmunización de refuerzo no está permitido).

El protocolo utilizado para realizar la inducción de la artritis se muestra de forma esquemática en la figura 3.1.



Figura 3.1 Protocolo de inducción de CIA.

3.1.2.3 Monitorización y evaluación de la severidad de la artritis

Para la monitorización macroscópica de la artritis se estableció un sistema de puntuación en los que se evaluó la severidad de la enfermedad teniendo en cuenta varios signos clínicos de artritis. Cada miembro se valoró individualmente, lo que supuso un máximo de 16 puntos por ratón. La evaluación se realizó semanalmente, de la siguiente manera:

- 0 = normal
- 1 = eritema e hinchazón leve confinada al mediopié (articulaciones tarsales) o articulación del tobillo
- 2 = eritema e hinchazón leve que se extiende desde el tobillo hasta el mediopié
- 3 = eritema e hinchazón moderada que se extiende desde el tobillo hasta la articulación metatarsiana
- 4 = eritema e hinchazón severa del tobillo, el pie y los dedos, con rigidez articular

3.1.2.4 Anatomía patológica e inmunohistoquímica

Para la evaluación histológica, los ratones artríticos se sacrificaron a las 2 (enfermedad temprana) o 7 (enfermedad tardía) semanas después del inicio de la AR. En primer lugar, las articulaciones se fijaron en una solución de

formaldehído 10 % en PBS durante 24-48 h a temperatura ambiente. Posteriormente se descalcificaron durante 3 semanas a 4 °C en tampón Tris-EDTA. Transcurrido este tiempo las muestras se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 3 µm y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las secciones fueron analizadas, estableciéndose una puntuación histológica de 0 a 4 para la inflamación, la erosión ósea y del cartílago así como la hiperplasia sinovial. El análisis histológico lo llevó a cabo un histopatólogo entrenado, mediante un estudio ciego.

La inmunohistoquímica (IHQ) se realizó en secciones de tejido embebido en parafina siguiendo la técnica de tinción con avidina-biotina-inmunoperoxidasa, sin recuperación previa de antígeno. Brevemente, se desparafinaron secciones de 4 µm y se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3 %, y después se incubó durante 30 min en suero de conejo al 10 %. La incubación con el anticuerpo anti-receptor de calcitonina de conejo (LS-C42899; LSBio) se realizó durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron durante 30 min con inmunoglobulinas biotiniladas, seguido de incubación durante 30 min con una dilución 1:25 del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ambos de Vector Laboratories). La diaminobencidina (DAB, Sigma) se utilizó como cromógeno y la hematoxilina como contratinción nuclear.

3.1.2.5 Análisis de proliferación de células T (incorporación de ³H-timidina)

Se sacrificaron ratones artríticos en diferentes momentos después del inicio de la enfermedad, se extirparon ganglios linfáticos inguinales, braquiales y axilares. Se procesaron por maceración hasta obtener una suspensión de células en medio RPMI (1x10⁷ cel/ml) y se cultivaron durante 72 h a 37 °C y 5 % de CO₂ en presencia de 0, 50 o 100 µg/ml de colágeno de pollo tipo II. Se añadió ³H-timidina (Amersham) a los cultivos celulares durante las últimas 18 h (1 µCi/pocillo, equivalente a 1 µL por pocillo) y se cuantificó la radioactividad en un contador de centelleo líquido (Beckman). La concanavalina A (1 µg/ml) se usó como control positivo de la proliferación de células T.

Paralelamente, se cultivaron células de ganglios linfáticos en las mismas condiciones anteriormente expuestas, pero en lugar de agregar ^3H -timimida, se recuperaron los sobrenadantes del cultivo celular, después de 24 h, y se cuantificaron las citoquinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-17, usando el correspondiente "Ready-Set-Go", de Affymetrix (eBioscience) (ver sección 3.2.3.1).

3.1.2.6 Ensayo de formación de fosas

La reabsorción ósea mediada por OCs se evaluó utilizando cortes de dentina de ballena (589). Las colonias CFU-GM se incubaron durante 15 días en rodajas de dentina previamente tratadas con M-CSF (25 ng/ml) (Prepotech) en presencia o ausencia de GzmA (3,5 $\mu\text{g/ml}$) o TNF (100 ng/ml). Como control positivo se utilizaron RANKL (50 ng/ml) (Biotech) más M-CSF. Los OCs se separaron con tripsina, y la formación de fosas se verificó por microscopía confocal.

3.1.3 Colitis y cáncer asociado a colitis

La inducción de colitis aguda o crónica se realizó empleando Sulfato de Dextrano Sódico (DSS, del inglés "Dextran Sulfate Sodium") (MW 36.000–50.000 de MP Biomedicals). Por otro lado, la inducción de CAC se realizó con una combinación de DSS y azoximetano (AOM) (Sigma Aldrich) (564, 590).

3.1.3.1 Inducción de colitis crónica y aguda

La colitis crónica se indujo mediante 3 ciclos de DSS al 2,5 %, administrado en el agua de beber. Cada ciclo tuvo una duración de cinco días, seguidos de 2 semanas de descanso con agua sin tratamiento. Todos los ratones tuvieron acceso *ad libitum* al agua de beber, que contenía DSS al 2,5 % o agua sin tratamiento (grupo control).

En algunos experimentos se indujo colitis aguda, para lo cual se administró DSS al 2,5 % en el agua de beber durante cinco días (un ciclo), y los animales fueron sacrificados 10 días después de iniciar el tratamiento.

3.1.3.2 Inducción de cáncer asociado a colitis (CAC)

El CAC se indujo mediante inyección intraperitoneal (ip) de una dosis única del agente mutagénico AOM (10 mg/kg) el primer día de tratamiento, seguido de 3 ciclos de DSS al 2,5 % en el agua de beber durante cinco días, con descanso entre ciclos de dos semanas. Para llevar a cabo estos experimentos, se preparó una solución de AOM, en solución salina isotónica, a una concentración de 1 mg/ml. Para la mayor precisión en la dosificación, cada animal se pesó y se calculó el volumen a administrar multiplicando el peso del animal (kg) x la dosis (mg/kg) y luego se dividió por la concentración de la solución de trabajo (mg/ml). Al preparar la solución de trabajo a 1 mg/ml se garantizó que:

Volumen de AOM a administrar (μL) = peso del ratón (g) x 10

El mismo volumen de solución isotónica se inoculó en los grupos control.

En la figura 3.2 se muestra el protocolo utilizado para inducir colitis y CAC.

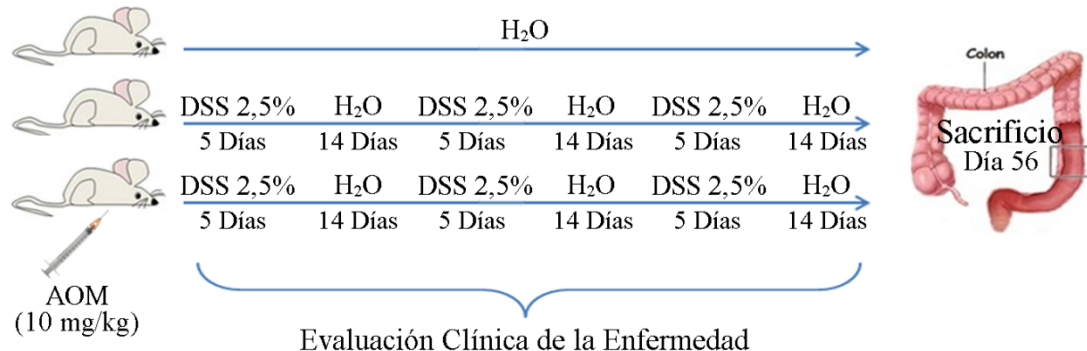


Figura 3.2 Protocolo de inducción de Colitis y CAC.

En tres experimentos independientes se inhibió *in vivo* la GzmA en ratones wt tratados con DSS/AOM. Para ello se indujo CAC, tal y como se indica anteriormente. A partir del día 35, un grupo de ratones se trató con cinco dosis de serpinb6b, un inhibidor selectivo de la GzmA de ratón. Se administraron 20 μg por vía intravenosa cada dos días. Como control se utilizó un grupo de ratones a los cuales se les administró serpinb6b previamente inactivado con tripsina. Los ratones fueron sacrificados 49 días después de iniciar el experimento. Se analizó el daño a nivel macroscópico en el colon, así como la incidencia, el número y el

tamaño de los tumores. Una porción de colon se cultivó para determinar el nivel de citoquinas inflamatorias presentes en el sobrenadante del cultivo de los explantes de tejido de colon.

En algunos experimentos se inhibió *in vivo* la IL-6 en ratones wt y en ratones deficientes en $Gzma^{-/-}$, tratados con DSS/AOM. Para ello, se indujo CAC tal y como se indica anteriormente. En dos experimentos, a partir del día 35 y hasta el día 50, a un grupo de ratones de ambas cepas se les administró un total de 6 dosis del anticuerpo monoclonal anti-IL6 (MP5-20F3, BioXcell). El sacrificio se realizó el día 56 después de iniciado el tratamiento con DSS/AOM. Se administraron 200 μ g/ratón del anticuerpo por vía i.p cada 72 h. Como control, se utilizaron ratones a los cuales se les administró un isotipo IgG1 hecho en rata (BioXcell). En otro experimento se inhibió de forma tardía la IL-6, esta vez se administraron un total de 5 dosis, a razón de 200 μ g/ratón del anticuerpo monoclonal anti-IL6, por vía ip cada 48 h, desde el día 56 hasta el día 64 del tratamiento. El sacrificio se realizó el día 70. En la necropsia se analizó el daño a nivel macroscópico en el colon, así como la incidencia y el número de tumores. Una porción de colon se cultivó para determinar el nivel de citoquinas inflamatorias presentes en el sobrenadante del cultivo de los explantes de tejido de colon.

Se realizó un experimento en el que se inhibió *in vivo* el TNF- α , en ratones wt y en ratones deficientes en $Gzma^{-/-}$, tratados con DSS/AOM. Para ello, se indujo CAC tal y como se indica anteriormente. En dicho experimento, a partir del día 56 y hasta el día 60, a un grupo de ratones de ambas cepas se les administró un total de 5 dosis de del antagonista específico del TNF- α humano, Enbrel (etanercept) (Pfizer), cedido amablemente por la Dra. Ana María Ortiz García del servicio de reumatología del Hospital universitario de La Princesa. El sacrificio se realizó 67 días después de iniciar el tratamiento con DSS/AOM. Se administraron 5 mg/kg/ratón, del antagonista por vía ip cada 24 h. Como control se utilizaron ratones a los cuales se les administró PBS. En la necropsia se cuantificó el número de tumores por ratón, así como la incidencia de tumores.

3.1.3.3 Puntuación clínica

Los ratones fueron pesados y supervisados diariamente. El sistema de evaluación establecido asignó puntuaciones de gravedad a cinco parámetros diferentes: pérdida de peso, consistencia de las heces, sangre fecal, comportamiento del ratón y deshidratación (Tabla 3.5). La puntuación clínica final es el resultado de la adición de cada parámetro individual, con un máximo de 24 puntos por ratón.

Parámetro y Puntuación	
Cambios en el peso (g)	<1 %=0; 1-5 %=1; 5-10 %=2; 10-20 %=3; >20 %=4
Consistencia de las heces	Normal=0; heces blandas=1; diarrea=4
Sangramiento visible	No visible=0; sangramiento visible=4
Comportamiento del ratón	Normal=0; cambios ligeros=1; anormal=4; inmovilidad=8
Deshidratación	Normal=0; deshidratación=4

Tabla 3.5 Valoración de la puntuación clínica.

3.1.3.4 Puntuación del daño macroscópico

Al final del experimento se sacrificaron los animales, se midió y pesó el colon y se puntuó el daño visible a nivel del colon. El sistema de puntuación establecido asignó valores de gravedad a seis parámetros: Diarrea (normal = 0; suave = 1; líquida = 4), Sangrado (No = 0; Sí = 4), Eritema (No = 0; Leve y/o localizado = 1; Intenso y/o generalizado = 2), Edema (No = 0; Leve y/o localizado = 1; Intenso y/o generalizado = 2), Estenosis (No = 0; 1 Estenosis = 1; 2 Estenosis = 2; > 2 Estenosis = 3) y adhesiones (Sin adherencias = 0; Disección difícil = 1; Adhesiones visibles = 2; intestino "Envuelto" = 3). De manera similar a la evaluación clínica, la puntuación del daño macroscópico total se obtuvo mediante la suma de la puntuación individual de cada parámetro.

Durante la evaluación macroscópica del daño en el colon de los animales con CAC también se cuantificaron la incidencia, el número y el diámetro de tumores por ratón.

3.1.3.5 Evaluación histológica de la inflamación

Para el análisis microscópico, se extrajo el colon de los ratones y se retiró una porción de los extremos distal y proximal de cada tejido. Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 24 h y luego se preservaron a 4 °C en etanol al 60 % hasta que se incluyeron en parafina. Las muestras fueron cortadas en secciones de 3 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). La puntuación de la inflamación se realizó según Izcue et al. (2008) (443). Brevemente, cada muestra se clasificó semicuantitativamente de 0 a 3 según los cuatro criterios siguientes: grado de hiperplasia epitelial y agotamiento de las células caliciformes, infiltración de leucocitos en la lámina propia, área del tejido afectado y presencia de marcadores de inflamación severa (como abscesos de cripta, inflamación de la submucosa y úlceras). Las puntuaciones individuales para cada parámetro evaluado se sumaron y se obtuvo una puntuación total para el daño microscópico intestinal con valores de 0 a 12.

3.1.3.6 Determinación del grado tumoral

La evaluación del grado tumoral se realizó mediante doble ciego. Los tumores se clasificaron en: displasias de bajo grado, displasias de alto grado y adenocarcinoma, utilizando los criterios de clasificación de displasia en la EII humana (591), así como la clasificación TNM de tumores colorrectales (330).

Según los criterios para la clasificación de displasias en la EII humana, se catalogan como displasias de bajo grado, aquellas displasias que cursan con arquitectura del epitelio intacto, o leve alteración del mismo y además, alteraciones nucleares que se extienden a la superficie de la mucosa sin una pérdida apreciable de polaridad nuclear. Por otro lado, son consideradas displasias de alto grado aquellas con alteraciones de la arquitectura de moderadas a severas, con evidencia clara de una pérdida de polaridad nuclear.

La clasificación TNM de tumores colorrectales especifica el nivel de invasión del tumor, y va desde carcinoma in situ hasta invasión de submucosa.

Se tomaron fotomicrografías de los tejidos teñidos con H&E, y de las secciones de colon inmunoteñidas, con un microscopio Axioplan 2 equipado con

una cámara AxioCam HRc y el software de análisis de imágenes Axiovision 4.6 (Zeiss).

3.1.3.7 Estudio inmunohistoquímico de marcadores de proliferación y EMT

La IHQ se llevó a cabo con los siguientes anticuerpos: anti- β -catenina (1/300), anti-Ki-67 (1/200) y anti-vimentina (1/100) (BD Biosciences), anti-p-STAT3 (Cell Signaling; dilución 1/200), y anti-SNAIL (sobrenadante de cultivo de tejidos).

El análisis IHQ se realizó sobre muestras de tejido de colon cortado en secciones de 3 μ m. Las muestras fueron obtenidas a partir de tejido embebido en bloques de parafina, previamente fijada en paraformaldehído al 4 %. La recuperación del antígeno se realizó hirviendo los portaobjetos en citrato de sodio 10 mM, pH 6,6, durante 10 min (E-cadherina, Ki67 y vimentina); en Tris base 10 mM, EDTA 1 mM, pH 9, durante 15 minutos (β -catenina, SNAIL) o durante 15 min en EDTA 1 mM, pH 8 (p-STAT3). Los portaobjetos se bloquearon con leche sin grasa, filtrada y disuelta en PBS al 5 % (en TBS más 0.1 % de Tween-20 (Sigma) en el caso de p-STAT3 y SNAIL).

En el caso de SNAIL, después del bloqueo de las peroxidasas endógenas, se permeabilizaron las membranas con TBS que contenía Triton X-100 (Sigma) al 1 % y Tween-20 al 1 %, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron dos veces con TBS más Tween-20 al 0,1 %. Para el bloqueo de uniones inespecíficas, las preparaciones se incubaron 2 h a temperatura ambiente con NGBS (suero normal de cabra al 10 %, BSA al 1 %, gelatina de pescado fría al 0,1 %, Triton X-100 al 0,1 %, Tween-20 al 0,05 %, y azida de sodio al 0,05 %) (592).

Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS que contenía BSA al 1 % (excepto en el caso de SNAIL para el que se añadió 1 % de NGBS al sobrenadante de cultivo tisular del hibridoma) y se incubaron durante 90 min a 37 °C o durante toda la noche a 4 °C. Como anticuerpos secundarios, se usaron los correspondientes anticuerpos anti-ratón o anti-conejo marcados con HRP (del inglés, "Horseradish Peroxidase") (BD Biosciences). Como sustrato colorimétrico

para HRP, se utilizó DAB (Vector). Posteriormente las secciones de tejido se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron los cubreobjetos para proteger las preparaciones.

Se enumeraron las células positivas en 5 campos visuales elegidos al azar para cada muestra de tejido, con la ayuda del software ImageJ. Para ki67, el porcentaje de núcleos teñidos positivamente se determinó utilizando el software de análisis de imágenes ImmunoRatio, como complemento del software ImageJ o como un programa en línea, de acceso gratuito, para el análisis de imágenes de IHQ (593) (<http://153.1.200.58:8080/immunoratio>).

La visualización y escaneo de los portaobjetos con IHQ se realizó en el escáner ZEISS Axio Scan.Z1, con un aumento de 20X.

3.1.3.8 Estudio de la permeabilidad intestinal en ratones wt y GzmA^{-/-}

Para el estudio comparativo de la permeabilidad intestinal se usaron ratones sanos wt y ratones GzmA^{-/-}. En primer lugar, se pesaron los ratones y después se les administró FITC-dextran (FD4; Sigma-Aldrich) por vía oral con la ayuda de una sonda gástrica, a una dosis de 40 mg por cada 100 g de peso. Se marcaron los ratones y se anotó la hora exacta de la administración.

Transcurridas 4 h, se sacrificaron los ratones por sobredosis de anestesia y se extrajo la sangre mediante punción cardíaca. Posteriormente, se obtuvo suero a partir de la sangre extraída centrifugando a 1.500 xg durante 20 min. Se diluyó el suero PBS (1:1).

Se preparó una curva estándar con diferentes concentraciones de FD4 (8.000, 4.000, 2.000, 1.000, 500, 250, 125 y 0 ng/ml) en suero de ratón sano, diluido previamente en PBS (1:1).

En una placa de 96 pocillos de fondo plano (Costar) se adicionaron 100 µl de los patrones y de las muestras. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Se determinó la fluorescencia a $\lambda_{exc}=485$ nm y $\lambda_{em}=528$ nm en el lector de placa Synergy™ HT, BioTek. Se estimó la concentración de FITC-

dextrano utilizando la curva de concentración de los estándares frente a la intensidad de fluorescencia.

3.1.3.9 Aislamiento de linfocitos intraepiteliales (IELs)

En primer lugar, se sacrificaron los ratones y se extrajo el colon. Luego se limpió el tejido pasando PBS 1X por el interior con ayuda de una jeringuilla. Una vez limpios, los intestinos se abrieron longitudinalmente y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 0,5 cm.

Posteriormente, se incubaron en 5 ml de solución de pre-digestión, previamente preparada (HBSS 1X (sigma), EDTA 5 mM, ditioneitol 1 mM (DTT, Fisher Scientific) y SFB 5 % (Sigma)) durante 20 min a 37 °C con agitación leve. Este proceso se repitió dos veces. Después de cada incubación se agitó vigorosamente durante 10 seg y se hizo pasar la suspensión celular por un tamiz de 100 µm, para recolectar el sobrenadante. Una vez concluido los dos ciclos de pre-digestión, se lavó el tejido residual en HBSS 1X y se incubó durante 20 min a 37 °C con agitación leve.

El sedimento obtenido contenía las criptas que se usaron para la purificación de IELs. Para ello, en primer lugar, se centrifugaron las células a 500 xg durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 10 ml de una solución de Percoll al 40 %. Después, se colocó cuidadosamente esta solución sobre 5 ml de Percoll al 80 %. Se centrifugó el gradiente de Percoll 40/80 a 1.000 xg durante 20 min a 20 °C sin freno. Se recogieron las IELs del anillo intermedio de la interfase de las dos soluciones de Percoll. Las células recogidas (el anillo intermedio) se pasaron a un tubo de fondo cónico de 50 ml y se lavaron con 30 ml de PBS 1X. Se centrifugó a 500 xg durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 ml de PBS con SFB 5 %. Las IELs purificadas se usaron para identificar las células que expresan GzmA, mediante citometría de flujo (ver sección 3.2.5).

3.1.3.10 Composición de microbiota intestinal

Se recogieron heces de ratones wt y de ratones deficientes en GzmA después de una suave estimulación perianal. Se extrajo el DNA total usando el

QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Las muestras de DNA se enviaron a la fundación FISABIO (<http://fisabio.san.gva.es>) para la secuenciación masiva de las regiones V3 y V4 de la subunidad 16S del rDNA.

Los cebadores utilizados fueron:

Forward:

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

Reverse:

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Las afiliaciones taxonómicas se asignaron utilizando la base de datos SILVA_release_119 (594). El análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico R y las bibliotecas de código abierto. Los datos cuantitativos de las lecturas se homogeneizaron utilizando su porcentaje relativo, a partir de las lecturas totales de cada muestra, para facilitar la comparación entre muestras. Finalmente, se utilizó la plataforma Galaxy Huttenhower Platform (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy>) para calcular el algoritmo LefSe (tamaño del efecto LDA) y así representar los taxones microbianos con diferencias significativas entre los grupos de muestras.

3.2 Análisis de la expresión de proteínas

3.2.1 Extracción de proteínas totales a partir del tejido congelado

Se pulverizaron los tejidos (articulaciones enteras, incluyendo huesos, tejido sinovial y tejidos adyacentes) usando un mortero y pistilo lleno de nitrógeno líquido. El tejido se transfirió a tubos de 15 ml, se colocó en hielo seco y se resuspendió en PBS (1 ml de PBS por cada 200 mg de tejido), que contenía cóctel de inhibidor de proteasa Complete™ (Roche) (una tableta por 25 ml de solución). Los tejidos triturados y homogeneizados se centrifugaron durante 10 min a 500 xg a 4 °C. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 ml, se centrifugaron a 15.000 xg durante 5 min y se recogieron para la cuantificación de GzmA (ver sección 3.2.3.2). La concentración de proteínas totales se determinó usando Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad) (ver sección 3.2.2).

3.2.2 Ensayo colorimétrico Bradford para estimar la concentración de proteínas

Se cuantificó la concentración de proteínas recombinantes y de proteínas totales extraídas de lisados celulares o de tejidos, mediante el ensayo Bradford. Para ello se utilizó el kit Quick Start™ Bradford Protein Assay BioRad. Brevemente, se preparó la curva patrón de BSA como se indica en el manual de procedimiento del Kit. Se utilizó como diluyente el mismo tampón en el que se disolvieron las muestras a analizar. Se cargaron 5 µl de las diferentes concentraciones de la curva patrón y de las muestras, por triplicado, en una placa de 96 pocillos de fondo plano y, a continuación, se añadieron 245 µl de azul de Coomassie. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y finalmente se midió la absorbancia a 595 nm. Se determinó la concentración de la proteína en cuestión (o de las proteínas totales) utilizando la recta de calibrado.

3.2.3 Cuantificación de proteínas por ELISA

3.2.3.1 Cuantificación de Citoquinas por ELISA

Para cuantificar, en los sobrenadantes de cultivos de células de ganglios linfáticos, en los explantes de tejido de colon o en el suero, las siguientes citoquinas: IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-17, se utilizaron los correspondientes Kits "Ready-Set-Go", de Affymetrix (eBioscience).

Para el caso específico del tejido de colon, éste se cortó en porciones de 30 mg (distal y proximal) y se mantuvo en 2 ml de medio de cultivo (DMEM suplementado con SFB al 10 %, glutamina 10 mM, HEPES 10 mM (Sigma) y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina) a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂. Después de 24 h, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a 500 xg durante 10 min y se almacenaron alicuotadas a -80 °C para posteriormente realizar el ELISA correspondiente. En el caso del cultivo de células de ganglios linfáticos se procedió según lo descrito en la sección 3.1.2.5.

De forma general, se adicionaron 100 µl del anticuerpo de captura a la concentración recomendada, en tampón de revestimiento, a la placa de ELISA

de 96 pocillos (NUNC Maxisorp) y se incubó toda la noche a 4 °C. Se lavó la placa 3 veces con 200 µl de solución de lavado (1X PBS con 0.05 % Tween-20) y seguidamente se bloqueó con 200 µl de tampón de ensayo durante 1 h a temperatura ambiente. Se adicionó el patrón y el blanco como recomienda el fabricante, además de las muestras diluidas en tampón de ensayo, incubándose 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar la placa 3 veces con solución de lavado, se adicionaron 100 µl del anticuerpo de detección conjugado con biotina a la concentración recomendada y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Se lavó la placa 3 veces con solución de lavado, se adicionaron 100 µl de enzima avidina-HRP (1:4000 en tampón de ensayo) y se incubó durante 30 min. Seguidamente, se lavó la placa 5 veces y se adicionaron 100 µl de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina), tras 15 min se detuvo la reacción adicionando 50 µl de H₂SO₄ 1M. Se determinó la absorbancia en un lector de placa (Synergy™ HT, BioTek) a 450 nm y 570 nm y se restaron los valores obtenidos a dichas longitudes de onda (Abs 450-Abs 570).

3.2.3.2 Cuantificación de GzmA por ELISA

Para cuantificar GzmA de ratón a partir de proteínas totales de tejido congelado, en los sobrenadantes de cultivos de explantes de tejidos de colon o en suero, se realizó un ELISA tipo sándwich indirecto usando anticuerpos contra GzmA de ratón hechos en rata y conejo. Estos anticuerpos fueron previamente producidos inmunizando ratas o conejos, siguiendo protocolos convencionales. Como anticuerpo de captura se utilizó IgG de conejo purificado a 2 µg/ml, disueltos en NaHCO₃, pH 9,6. Como anticuerpo de detección se usó el inmunosuero policlonal de rata diluido en PBS (1: 1000). Como anticuerpo secundario se usó anticuerpo contra IgG de rata hecho en cabra (Sigma) conjugado con HRP, diluido en PBS (1: 20000). Se determinó la absorbancia en el lector de placa (Synergy™ HT, BioTek) a 405 nm y 570 nm y se restaron los valores obtenidos a dichas longitudes de onda (Abs 450-Abs 570).

3.2.3.3 Cuantificación Telopéptido C-terminal de colágeno tipo I (ICTP) por ELISA

Se obtuvo suero de ratones wt y de ratones $GzmA^{-/-}$ y se congeló a -80°C para el posterior análisis de ICTP, con un kit de ELISA de BlueGene, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la detección y cuantificación de ICTP este kit se basa en la técnica de inmunoensayo enzimático competitivo, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-ICTP y un conjugado de ICTP-HRP. Las muestras de ensayo se incubaron con el conjugado ICTP-HRP en una placa recubierta con el anticuerpo monoclonal anti-ICTP durante 1 h. Después de este período, la placa, previamente lavada, se incubó con un sustrato para la enzima peroxidasa. El producto de la reacción enzima-sustrato formó un complejo de color azul. Finalmente, se agregó una solución para detener la reacción. La intensidad del color se midió espectrofotométricamente a 450 nm en un lector de placa (Synergy TM HT, BioTek). En este tipo de ensayo la intensidad del color era inversamente proporcional a la concentración de ICTP, ya que el ICTP de las muestras y el conjugado ICTP-HRP compiten por el sitio de unión del anticuerpo anti-ICTP. Para evaluar los resultados en primer lugar se realizó una curva que relacionaba la intensidad del color (Abs) con la concentración de los estándares. Posteriormente se extrapola la concentración de ICTP en cada muestra a partir de esta curva estándar.

3.2.3.4 Cuantificación de anticuerpos IgG anti colágeno tipo II por ELISA

Para cuantificar anticuerpos totales IgG frente a colágeno tipo II en el suero de ratones con CIA, se utilizó un kit de ELISA de Chondrex, siguiendo las instrucciones del fabricante. En este kit de ELISA las placas estaban recubiertas con colágeno de pollo tipo II. Los estándares y las muestras se analizaron por duplicado. Se usaron las diluciones recomendadas por el fabricante y se incubaron a 4°C toda la noche. Como anticuerpo secundario se usó una IgG anti-ratón hecha en cabra, conjugada con HRP (1:200), proporcionada en el Kit. Se agregaron 100 μl de solución de anticuerpo secundario a cada pocillo y se

incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Como agente cromógeno se utilizó el diclorhidrato de orto-fenilendiamina (OPD) durante 30 min y tras detener la reacción (H_2SO_4 1M) se leyó la placa a 490 y 630 nm.

Para la determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2c anti colágeno tipo II en el suero se realizó un ELISA. Brevemente, se diluyó el colágeno bovino tipo II en Tris/HCl 0,05 M a una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$, se inmovilizó en placas Nunc MaxiSorp para ELISA y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Después, se bloquearon las uniones inespecíficas con PBS y 2 % de BSA, durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con diluciones seriadas de suero de ratones wt y de ratones $\text{GzmA}^{-/-}$ con artritis inducida por colágeno. Como anticuerpos de detección se usaron anticuerpos contra IgG1 o IgG2c (Southern Biotech) de ratón, hechos en cabra, conjugados con HRP, diluidos en PBS con 1 % BSA (1:500). Se añadieron 50 μl de TMB como agente cromógeno y luego se detuvo la reacción con 25 μl de H_2SO_4 1M tan pronto como los controles sanos se volvieron azules. Se realizó la lectura de la placas en el lector de placa (Synergy™ HT, BioTek) a 450 y 570 nm.

3.2.4 Análisis de proteínas por Western-Blot

3.2.4.1 Extracción de proteínas totales a partir de lisados celulares

Para realizar los lisados celulares, se retiró cuidadosamente el medio de cultivo de las células adherentes. Las células se lavaron dos veces con PBS frío. Posteriormente se añadió tampón RIPA (25mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% SDS) (Thermo Fisher) frío a las células. Se utilizó 1 ml de tampón RIPA por cada 5×10^6 células. Previamente, justo antes de ser utilizado, se adicionó al tampón RIPA cóctel de inhibidor de proteasa Complete™ (Roche) e inhibidor de fosfatasa (Sigma). Se incubó en hielo durante 5-10 min, girando la placa de vez en cuando para lograr una distribución uniforme. Se recogió el lisado con ayuda de un raspador de células y se transfirió a un tubo de microcentrífuga. Las muestras se centrifugaron a 14.000 xg durante 15 min a 4 °C, para sedimentar los residuos celulares. Se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo para su posterior análisis. La concentración de proteínas totales se

determinó usando Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad) (ver sección 3.2.2)

Una vez determinada la concentración de proteínas totales en el lisado celular se añadió tampón de carga 3X (Tris-HCl 150 mM pH 7,4, Sigma; 3 %, SDS, Merck; molibdato de sodio 0,3 mM, Sigma; pirofosfato de sodio 30 mM, Sigma; fluoruro de sodio 30 mM, Sigma; glicerol 30 % v/v, Scharlau; 2- β -mercaptoetanol 30 % v/v, Sigma y azul de bromofenol 0,06 % p/v). Finalmente, los lisados se incubaron durante 5-10 min a 95 °C en un baño seco (Selecta), se centrifugaron, y se cargaron en un gel o bien se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

3.2.4.2 Separación de proteínas celulares. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La separación de proteínas en función de su peso molecular se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida que contenía un 0,1 % de SDS. El porcentaje de poliacrilamida varió entre el 10 y el 12 %, dependiendo del tamaño de las proteínas a analizar. La electroforesis se realizó a un amperaje constante de 20 mA/gel y un voltaje de 180 V durante 60-90 min.

3.2.4.3 Transferencia de proteínas a membranas

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (*del inglés*, "Polyvinylidene fluoride"), pre-incubadas 30 s con metanol. El proceso se llevó a cabo en un equipo de transferencia semiseca de BioRad. La transferencia se realizó a 20 V y 400 mA durante 55 min.

3.2.4.4 Análisis de proteínas por inmunoblot (Western blotting)

Las proteínas celulares fijadas en las membranas de PVDF se analizaron con anticuerpos específicos. Previamente, y una vez terminada la transferencia, la membrana se bloqueó en una solución de PBS y 5 % de leche en polvo desnatada, a pH 7,4, durante 60 min. Seguidamente, la membrana se incubó durante toda la noche, a 4 °C con agitación suave, con el anticuerpo específico para detectar la proteína deseada. Los anticuerpos se diluyeron en PBS pH 7,4

con 0,1 % de Tween-20 y leche en polvo desnatada al 2,5 % (p/v) (solución A). Finalizada la incubación, se desechó la solución con el anticuerpo y la membrana se lavó con PBS pH 7,4 que contenía 0,1 % de Tween-20 (solución B), 4 veces durante 5 min, agitando moderadamente. Seguidamente, las membranas se incubaron en la solución A con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 3.6). Esta incubación se realizó durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Transcurrido el tiempo de incubación la solución del anticuerpo secundario se eliminó y se lavó 3 veces la membrana durante 10 min, agitando moderadamente, con la solución B. La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante captación de la señal infrarroja. Las membranas se escanearon en el ODYSSEY CLx (LI-COR). El análisis cuantitativo de las bandas se realizó por densitometría con la ayuda del software ImageJ. De este modo, se analizó, en función de la intensidad de cada banda por unidad de superficie, el nivel de expresión de la proteína de interés y de una proteína de referencia, concretamente β -actina o GAPDH.

Los anticuerpos primarios y secundarios usados en este estudio, las concentraciones a las que fueron utilizados, así como la casa comercial de la que procedían, se indican en la tabla 3.6.

Anticuerpo	Concentración	Casa comercial
Anti-p-STAT3 (Tyr705)	1/1000	Cell Signaling
Anti-p-NF-κB p65 (Ser536)	1/1000	Cell Signaling
Anti-IκBα (44D4)	1/1000	Cell Signaling
Anti-β-Actina	1/5000	Sigma
Anti-GAPDH	1/5000	Sigma
IRDye® 800CW Anticuerpo anti-ratón hecho en cabra	1/20000	LI-COR
IRDye® 680RD Anticuerpo anti-ratón hecho en cabra	1/20000	LI-COR

Tabla 3.6 Anticuerpos primarios y secundarios usados para western blot. GAPDH (del inglés, "Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase").

3.2.5 Análisis de proteínas de la superficie celular por citometría de flujo

El análisis de la presencia de determinadas proteínas de membrana mediante citometría de flujo se realizó con anticuerpos conjugados con fluorocromos (Tabla 3.7). Para ello, las IELs aisladas se incubaron en 100 µl de PBS suplementado con 5 % de SFB durante 15 min a 4 °C, con la cantidad de anticuerpo indicada por la casa comercial. Trascurrido este tiempo, se lavaron 3 veces con PBS suplementado con 5 % de SFB y se analizaron por citometría de flujo. En los casos en los que no se hizo el análisis inmediatamente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % (PFA 2 %) a 4 °C hasta 24 h después.

3.2.5.1 Análisis intracelular de GzmA por citometría de flujo

Las Gzms son proteínas intracelulares contenidas en los gránulos citotóxicos. Para analizar su expresión en IELs, las células se fijaron durante 15 min a 4 °C con 200 µl de PFA 1 % en PBS. A continuación se lavaron 2 veces con PBS suplementado con 5 % de SFB y se resuspendieron en 100 µl de una solución de permeabilización (saponina 0.1 % en PBS suplementado con 5 % de SFB) que contiene el anticuerpo que reconoce a la GzmA (anti-GzmA PE; dilución 1/1000). Como control se usó el isotipo IgG1 de ratón hecho en cabra conjugado con PE (dilución 1/1000). Se incubaron las células con el anticuerpo y el isotipo durante 1 h a temperatura ambiente. Para finalizar, las células se lavaron 2 veces con el tampón de permeabilización y se resuspendieron en PFA 2 % para su análisis por citometría de flujo.

En la tabla 3.7 se muestran los anticuerpos utilizados en el análisis de proteínas por citometría de flujo, así como la concentración a las que fueron usados y la casa comercial de la que procedían.

Anticuerpo	Concentración	Casa comercial
CD3 FITC	1/50	Miltenyi Biotec
CD8α APC	1/250	Miltenyi Biotec
CD4 APC	1/50	Miltenyi Biotec
Granzima A PE	1/1000	Miltenyi Biotec
IgG1 PE	1/1000	Miltenyi Biotec
NK1.1 APC-Vio770	1/50	Miltenyi Biotec
CD45 VioBlue	1/250	Miltenyi Biotec
CD11b FITC	1/50	Miltenyi Biotec
F4/80 APC	1/50	Miltenyi Biotec
Ly6G VioBlue	1/250	Miltenyi Biotec

Tabla 3.7 Anticuerpos usados para citometría de flujo.

3.3 Sobreexpresión y purificación de proteínas

3.3.1 Preparación de medios y cultivos de *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*

El manejo de cultivos de *E. coli* y *P. pastoris* se realizó dentro del área estéril creada por la llama de un mechero de alcohol, usando siempre medios de cultivo autoclavados.

Para preparar medio Luria Bertani (LB), se pesaron 10 g de triptona (Panreac), 5 g de extracto de levadura (Panreac) y 5 g de NaCl (Merk). Se disolvieron en 950 ml de agua destilada, se ajustó el pH de la solución a 7,5 y se completó el volumen hasta 1L. Se esterilizó la solución en autoclave (Autestar Mod 4376, Selecta). Para preparar placas de LB-agar, se pesaron 20 g de Agar (Sigma) y se disolvieron en 1 L de LB.

Para preparar medio YPD (del inglés, “Yeast Extract Peptone Dextrose Medium”) se disolvieron en 900 ml de agua: 20 g de peptona (Panreac) y 10 g de

extracto de levadura (Panreac). Se esterilizó la solución en autoclave y cuando se enfrió la solución a ~ 60 °C se agregaron 100 ml de una solución de D-glucosa (Merk) 10 X, previamente preparada y esterilizada por filtración (20 g en 100 ml de agua).

Para preparar medio YPM (del inglés, “Yeast Extract Peptone Methanol Medium”) se disolvieron en 900 ml de agua: 20 g de peptona (Panreac) y 10 g de extracto de levadura (Panreac). Se esterilizó la solución en autoclave y cuando se enfrió la solución a ~ 60 °C se agregaron 100 ml de una solución de metanol (Panreac) 10 X, previamente preparada y esterilizada por filtración (5 ml en 100 ml de agua).

Para preparar medio con biotina y dextrosa para la regeneración celular (RBD) primero se disolvieron 186 g de D-sorbitol (Sigma) y 20 g de agar bacteriológico en 790 ml de agua y se esterilizó la solución en autoclave. Aparte, se disolvió 134 g de base de nitrógeno de levadura (YNB, Sigma), con sulfato de amonio, y sin aminoácidos, en 1 L de agua. Se calentó ligeramente para disolver y se esterilizó por filtración. Por otro lado, se fundió el sorbitol-agar y se dejó enfriar a 60 °C. Después, se agregaron las siguientes soluciones precalentadas a 45-50 °C: 100 ml D-glucosa al 20 % (p/v), 100 ml de YNB y 2 ml de biotina (Sigma) a una concentración de 0,2 g/L (previamente esterilizada por filtración). Por último, se añadieron 10 ml de la solución acuosa (previamente esterilizada por filtración) de los siguientes aminoácidos: ácido L-glutámico, L-metionina, L-lisina, L-leucina y L-isoleucina (500 mg/L, Sigma).

3.3.2 Expresión y purificación de GzmA en *Escherichia coli*

3.3.2.1 Inducción con IPTG

Para la expresión de GzmA se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pET21a+ que contenía un inserto de la pro-GzmA de ratón. El primer día se realizó un primer pre-cultivo inoculando 20 µl del stock de esta bacteria (congelada en 30 % de glicerol) en 10 ml de LB con 100 µl/ml de ampicilina (Sigma) y se incubaron a 37 °C durante 12 h con agitación constante. Transcurrido este tiempo, se añadieron los 10 ml del primer cultivo a 40 ml de

medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Se incubó a 37 °C toda la noche con agitación constante. Al día siguiente se añadieron los 50 ml del pre-cultivo a un matraz Erlenmeyer de 2 L, que contenía 450 ml de medio LB y se incubó a 37 °C con agitación constante, hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0.6 y 0.8. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, se separó 1 ml de cultivo, que fue utilizado como referencia inicial de la sobreexpresión de la proteína. Seguidamente se añadió IPTG (MP Biomedicals) a una concentración final de 1 mM y se incubó a 37 °C con agitación constante durante 3 h. Transcurrido ese tiempo, en primer lugar se reservó 1 ml del medio de cultivo para posteriormente constatar la sobreexpresión de la proteína en un gel de poliacrilamida. Después, se centrifugó el cultivo a 8.000 xg durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 10-15 ml de PBS y se centrifugó nuevamente a 8.000 xg durante otros 15 min. Se eliminó el sobrenadante y se pasó el pellet a un tubo para centrífuga cónico de 50 ml. Por último, se congeló a -20 °C para su posterior uso.

3.3.2.2 Obtención de cuerpos de inclusión

Para la purificación de GzmA, se descongeló el pellet bacteriano obtenido en el paso anterior, y se resuspendió en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 2 mM, lisozima 2 mg/ml (Sigma-Aldrich), DNAasa 1 mg/ml (Sigma-Aldrich), inhibidor de proteasa 1 X y Triton X al 0,5 % (Sigma)). Por cada gramo de pellet celular descongelado se utilizó 1 ml de tampón de lisis. La mezcla se colocó en un agitador vertical a 4 °C durante 2 h. Después se lisaron las células mediante disrupción mecánica por sonicación. Para ello, se pasó la suspensión a un vaso de precipitado en hielo y se sonicó a $\frac{3}{4}$ de amplitud y $\frac{3}{4}$ pulso durante 45 s, se dejó reposar durante 2 min y se repitió el proceso diez veces. Una vez lisadas las células se centrifugó a 50.000 xg durante 15 min a 4 °C.

3.3.2.3 Solubilización y replegamiento de las proteínas contenidas en los cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión obtenidos previamente se resuspendieron en tampón de desnaturalización (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, cloruro de

guanidinio 6 M (Sigma-Aldrich), EDTA 20 mM (Lonza) y DTT oxidado 10 mM, pH 8). Para ello, en primer lugar se pasaron los cuerpos de inclusión, varias veces, por una jeringuilla con una aguja 18 G. Se utilizaron 3 ml de tampón de desnaturalización por cada litro de medio de cultivo crecido. Se dejó incubar toda la noche a temperatura ambiente. Después, se centrifugó a 50.000 xg durante 15 min a 4 °C para eliminar el material insoluble y se recogió el sobrenadante.

En un paso posterior, el sobrenadante que contenía la GzmA sobreexpresada se colocó en 100 volúmenes de tampón de replegamiento compuesto por Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, arginina 500 mM (Sigma-Aldrich) y glicerol 10 % (Panreac AppliChem). El sobrenadante se añadió rápidamente al tampón de replegamiento con agitación y cuando se mezcló bien se detuvo la agitación. Se incubó en reposo, a temperatura ambiente, durante 72 h. Una vez completado el replegamiento de la proteína, se dializó 5 veces frente a 100 volúmenes de tampón MT-PBS (NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 4 mM (Panreac), Na₂HPO₄ 16 mM (Panreac), pH 7.4).

3.3.2.4 Purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico

La purificación de GzmA se realizó utilizando una columna de intercambio catiónico (HiTrap™ SP XL, 5 ml; General Electric Healthcare). Antes de comenzar la purificación se preparó la columna, para lo cual primero se lavó con 5 volúmenes de MT-PBS. Después, se equilibró con 5-10 volúmenes de MT-PBS 1M de NaCl y, por último, se volvió a lavar con 5 volúmenes de MT-PBS. Una vez preparada la columna se pasó la proteína a través de ella. Finalmente, se eluyó la GzmA con un gradiente de NaCl. Se obtuvieron varias fracciones de proteína purificada, de las que se tomaron 20 µl para analizarlas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (ver sección 3.2.4.2). Además, se realizó la identificación de la proteína por Western Blot utilizando como anticuerpo primario un policlonal de ratón hecho en rata (rata anti-GzmA de ratón) (1:100). Las fracciones con mayor concentración de proteína se unieron para su posterior activación.

3.3.2.5 Activación de la pro-GzmA

Una vez purificada la pro-GzmA se procedió a su activación utilizando catepsina-C (Sigma). En este caso, la catepsina-C escinde el dipéptido MK (*Met-Lys*) presente en el extremo N-Terminal de la pro-GzmA purificada, convirtiéndola en GzmA activa.

En primer lugar, se dializó la pro-GzmA en el tampón de actividad de catepsina-C (MT-PBS y acetato de sodio 0,2 M (Panreac), pH 5,5). Paralelamente a la diálisis, se activó la catepsina-C en 2 mM de DTT a 37 °C durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de activación de la catepsina-C, se realizó una diálisis con 100 volúmenes del tampón MT-PBS y acetato de sodio, pH 5,5, para así eliminar el DTT. Se reservó una alícuota de catepsina-C activa y se llevó a cabo un ensayo de actividad en una placa de 96 pocillos de fondo plano con varias diluciones seriadas de catepsina-C activa junto con su sustrato (H-Gly-Phe-pNA; Bachem). Como control negativo se usó catepsina-C sin activar, tampón de actividad solo y el sustrato de la catepsina-C disuelto en tampón de actividad. Se incubó a 37 °C y se realizaron mediciones a 405 nm cada h en el lector de placa Synergy™ HT, BioTek.

Finalmente, tras la diálisis, se pusieron a reaccionar ambas proteínas. Para ello se utilizaron 5 U de catepsina-C activa por cada 10 mg de pro-GzmA y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente se dializó la GzmA frente a 100 volúmenes de MT-PBS pH 7,4. Por último se hicieron alícuotas y se congelaron a -80 °C.

3.3.2.6 Determinación de la actividad enzimática de la proteína GzmA

Se determinó la actividad triptasa de la GzmA sobre el sustrato Bz-Pro-Phe-Arg-pNA-HCl (BACHEM). En resumen, se disolvieron 50 µl del sobrenadante del cultivo de explantes de tejido de colon, o de la proteína activada, en igual volumen de Tris-HCl 100 mM; pH 8,5 (buffer de actividad de GzmA). Como control positivo se usó el lisado de 10.000 células de la línea de linfocitos T citotóxicos, 1,3E6SN ("Cytotoxic T-lymphocyte Line") y como control negativo el lisado de 10.000 células de la línea tumoral de ratón EL4.F15, en 50

μl de buffer de actividad de GzmA. A continuación, se añadieron 50 μl/pocillo de sustrato Bz-Pro-Phe-Arg-pNA-HCl (concentración final 150 μM), disuelto en Tris-HCl 100 mM, pH 8,5. Las muestras se incubaron a 37 °C. Las mediciones se llevaron a cabo a 405/490 nm después de 0, 60, y 120 min. Todas las mediciones se realizaron por duplicado o triplicado, usando el lector de placas Multi-Mode Microplate Reader (Synergy™ HT, BioTek).

3.3.3 Expresión y purificación de Serpinb6b en *Pichia pastoris*.

El uso de organismos eucariotas inferiores, como la levadura *Pichia pastoris*, representa un sistema de expresión de proteínas ventajoso, lográndose buenos rendimientos sin la necesidad de biorreactores engorrosos o medios de cultivo complejos. Es importante destacar que las levaduras poseen un amplio rango de proteínas chaperonas conservadas que pueden ayudar al plegamiento de proteínas recombinantes y tienen, además, la capacidad de producir modificaciones postransduccionales similares a las de los mamíferos. En la producción de serpinas recombinantes, las levaduras tienen una ventaja adicional sobre sistemas eucariotas superiores, ya que no producen serpinas endógenas, lo que simplifica la purificación (191).

En este estudio, se expresó y purificó Serpinab6b (inhibidor específico de la GzmA de ratón) en el citoplasma de una cepa SMD1163 de *P. pastoris*. El vector de expresión usado fue pHIL-D2 (Invitrogen), lo que permitió la expresión intracelular de la proteína. El protocolo utilizado fue el descrito por Kaiserman et al (191).

3.3.3.1 Inducción con metanol

Se eligió una colonia de levadura bien aislada de una placa de RDB y se inoculó en 5 ml de YPD. Se incubó a 30 °C durante toda la noche con agitación. Transcurrido el tiempo de incubación del precultivo se inoculó 1 ml de éste en 500 ml de YPD. Se incubó durante 48 h a 30 °C con agitación. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 6.000 xg durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 500 ml de YPM y se devolvió a los matraces cónicos. Se volvió a incubar durante 72 h más a 30 °C con agitación.

3.3.3.2 Lisis del pellet celular

La lisis de la levadura se realizó mecánicamente, mediante agitación en presencia de perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro; Sigma). Este proceso genera mucho calor, lo que podría conducir a la polimerización de la proteína, por lo tanto, es importante enfriar la muestra tanto como sea posible durante la lisis.

Para llevar a cabo el proceso de lisis, en primer lugar se recogió la levadura por centrifugación a 6.000 xg durante 10 min a 4 °C. Se lavó una vez con Tris-HCl 20 mM y se resuspendió en tampón de lisis (NaCl 1 M, β -mercaptoetanol 10 mM, 20 mM Tris-HCl; pH 7,4), además se añadió una solución de coctel inhibidor de proteasas 1X. Se utilizaron 60 ml de tampón de lisis por cada litro de cultivo. Para facilitar el proceso, se dividió la muestra (pellet resuspendido en tampón de lisis) en alícuotas de 10 ml y se agregaron 5 ml de perlas de vidrio. Las muestras se agitaron en un vórtex a la máxima velocidad durante 30 s con intervalos de descanso, entre agitaciones, de 90 s. El proceso se repitió 8 veces. Por último, se centrifugó a 3.000 xg durante 5 min para separar las perlas de vidrio. Se recogieron los sobrenadantes y se volvió a centrifugar a 27.000 xg durante 30 min.

3.3.3.3 Purificación mediante cromatografía de afinidad por níquel

La serpinab6b utilizada en este estudio contenía una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal, lo que favoreció su purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel.

Para llevar a cabo el proceso, se cargó el lisado clarificado directamente en una columna HisTrap de 5 ml (GE Lifesciences). Se lavó la columna con al menos 5 volúmenes de tampón de lavado (NaCl 1 M, β -mercaptoetanol 10 mM, Tris 20 mM; pH 7,4). Posteriormente, se lavó la columna con 5 % de tampón de elución (NaCl 1 M, β -mercaptoethanol 10 mM, imidazol 0,5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4). Por último, se eluyó con un gradiente continuo desde 5 a 100 % de tampón de elución. Se agruparon las fracciones que contenían la serpinab6b, se alicuotaron y se congelaron a -80 °C.

3.4 Cuantificación de Prostaglandina E2 por ELISA

La prostaglandina E2 (PGE2) se cuantificó en los sobrenadantes de los explantes de tejidos de colon, con un kit ELISA de la casa comercial Arbor Assay, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se pipetearon en la placa 100 μ L de las muestras y los patrones proporcionados en el kit. Se añadieron 25 μ L del conjugado de Prostaglandina E2 DetectX® a cada pocillo y luego se adicionaron 25 μ L del anticuerpo de alta sensibilidad Prostaglandin E2 DetectX®. Se agitó la placa durante 15 min y luego se incubó a 4 °C durante 16 h. A la mañana siguiente, se lavó 4 veces con 300 μ L de tampón de lavado y se agregaron 100 μ L de sustrato TMB a cada pocillo. Después de incubar la placa a temperatura ambiente durante 30 min se detuvo la reacción con 50 μ L de la solución de parada (solución de ácido clorhídrico 1M) y se determinó la densidad óptica a 450 nm en el lector de placas Synergy™ HT, BioTek. Se cuantificó la concentración de PGE2 en las muestras por interpolación a partir de la curva de calibración.

3.5 Análisis de la expresión génica

3.5.1 Extracción de RNA y determinación de la expresión génica mediante RT-qPCR

La extracción de RNA total se llevó a cabo con el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, a partir del RNA total (100-500 ng), se generó cDNA con la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen Life Technologies). La PCR semicuantitativa en tiempo real se realizó usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en el equipo iCycler iQ™ (Bio-Rad, Hercules, CA). Se utilizaron cebadores específicos para GZMA y COX-2, en el caso de los experimentos de CAC, y cebadores específicos para TRAP, Cathepsin-K y MMP-9, en el caso de CIA. La reacción se llevó a cabo con un protocolo estándar (40 ciclos, temperatura de hibridación 60 °C). Los niveles relativos de expresión de mRNA de cada gen se normalizaron con respecto a los niveles de mRNA de HPRT (del inglés, “Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase”) (CAC) y MRP-L32 (proteína ribosómica

mitocondrial L32) (CIA), utilizando un método comparativo ($2^{-\Delta C_t}$). Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la tabla 3.8.

Cebador	Secuencia
GZMA forward	5'-GGTGGAAAGGACTCCTGCAA-3'
GZMA reverse	5'-GCCTCGCAAAATACCATCACA-3'
COX-2 forward	5'-TGCCTCCCACTCCAGACTAGA-3'
COX-2 reverse	5'-CAGCTCAGTTGAACGCCTTTT-3'
TRAP-forward	5'- TCCTGGCTCAAAAAGCAGT -3'
TRAP-reverse	5'- ACATAGCCCACACCGTTCTC -3'
Catepsina-K-forward	5'- CACCCAGTGGGAGCTATGGAA -3'
Catepsina-K-reverse	5'- GCCTCCAGGTTATGGGCAGA -3'
MMP-9-forward	5'- GCCCTGGAACCTCACACGACA -3'
MMP-9-reverse	5'- TTGGAAACTCACACGCCAGAAG -3'
HPRT-forward	5'-CTGGTGAAAAGGACCTCTCGAA-3'
HPRT-reverse	5'-CTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGGCAT-3
MRP-L32-forward	5'- CACCAGTCAGACCGATATGTGAAAA -3'
MRP-L32-reverse	5'- TGTTGTCAATGCCTCTGGGTTT-3'

Tabla 3.8 Secuencias de los cebadores utilizados en la q-RT-PCR.

El RNA total se extrajo de las articulaciones de la muñeca izquierda de los ratones sometidos a CIA, o del tejido de colon distal y proximal de los ratones tratados con DSS/AOM.

3.6 Cultivos celulares

Las células se cultivaron en un incubador termostatzado (CO. Incubator MCO-18AC, Sanyo) a 37 °C en una atmósfera enriquecida con un 5 % de CO₂.

Todas las manipulaciones se realizaron en campanas de flujo laminar vertical (Telstar) en condiciones estériles.

Los materiales y soluciones no estériles fueron esterilizados en un autoclave durante 21 min a 1 atmósfera de presión y a una temperatura de 121 °C o filtrados a través de membranas estériles de 0,22 µm (Millipore).

Las células se observaron en un microscopio invertido Leica y su recuento se realizó en una cámara de Neubauer.

3.6.1 Líneas celulares

En este estudio se trabajó con la línea celular MC-38, línea derivada de un adenocarcinoma de colon que se indujo químicamente mediante la inyección subcutánea de dimetilhidracina (DMH) en ratones hembra C57BL/6 (595). Esta fue cedida amablemente a nuestro laboratorio por el Dr. Pedro Berraondo López (Centro de Investigación médica aplicada (CIMA), Universidad de Navarra).

También se trabajó con una sublínea de células RAW 264.7, una línea celular modelo que actúa como un precursor para la formación de OCs, y que responde a estímulos osteoclastogénicos, incluidos RANKL y TNF-α (596).

3.6.2 Mantenimiento de los cultivos celulares

La línea celular CM-38 se cultivó en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Lonza) suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (SFB) y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) (Sigma). De forma rutinaria el cultivo se realizó en frascos de cultivo de 25 o 75 cm², con tapón con filtro (Thermo Scientific), en un volumen de 5 y 15 ml respectivamente. Para el mantenimiento las células se sembraron habitualmente a una densidad inicial de 5x10⁴ cel/ml. Para hacer los experimentos la densidad celular inicial dependió del tipo de experimento y los objetivos que se perseguían.

La línea celular RAW 264.7 se cultivó en DMEM suplementado con L-glutamina 4 mM (Sigma), bicarbonato de sodio 1,5 mg/ml (PanReac), glucosa

4,5 mg/ml (PanReac), piruvato de sodio 1,0 mM (Sigma), 10 % (v/v) de FBS y 2 mM de los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml).

Las células se cultivaron en un incubador con regulación de flujo de CO₂ a 37 °C, en aire saturado de humedad y con un 5 % de CO₂. Una vez alcanzada la densidad de saturación en estas condiciones, se establecieron subcultivos derivados de los iniciales.

Para ello, las células MC-38 se despegaron mediante incubación con tripsina/EDTA (Sigma), a 37 °C durante 5 min. Transcurrido ese tiempo se añadieron 5 ml de medio con suero para inactivar la tripsina, se transfirieron las células a tubos de fondo cónico y se centrifugaron durante 5 min a 300 xg (20 °C). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio fresco. A continuación se determinó el número de células y su viabilidad (tinción por exclusión con azul Trypan, Sigma) con ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio óptico, y se volvieron a sembrar en el volumen de medio fresco necesario para lograr las densidades celulares iniciales requeridas según los diferentes experimentos.

En el caso de la línea RAW 264.7, se eliminó el medio gastado, se agregó medio fresco y se despegaron las células usando un raspador de células (Thermo Scientific). Inmediatamente se agregó 0.01 ml de la suspensión celular a 0.09 ml de medio fresco en un tubo de microcentrífuga. Se contaron las células usando un hemocitómetro, se calculó la concentración celular y se sembraron a las densidades celulares requeridas para realizar los experimentos posteriores.

3.6.3 Congelación y descongelación de células

Las líneas celulares se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido, según el siguiente procedimiento: las células se cultivaron hasta alcanzar su densidad de saturación, se contaron, se centrifugaron a 300 xg durante 5 min y, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en su medio de cultivo habitual con un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) a una densidad celular de 5-10 x 10⁶ cel/ml. Rápidamente se hicieron alícuotas en criotubos estériles y se

congelaron a -80°C durante 24-72 h. Finalmente, se trasladaron a un contenedor de nitrógeno líquido, hasta el momento de su utilización.

La descongelación se realizó mediante la adición gradual de medio de cultivo atemperado a las células. A continuación, la suspensión se centrifugó durante 5 min a 300 xg y luego se resuspendieron las células en 5 ml de medio suplementado con 10 % de SFB.

3.6.4 Contaje y determinación de la viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular se utilizó la tinción por exclusión con azul Trypan (Sigma). Las células muertas, que han perdido la integridad de su membrana, son permeables a este colorante y adquieren una tonalidad azulada, mientras que en las células vivas y/o apoptóticas, que todavía mantienen su membrana plasmática intacta, no ocurre esto. Para el recuento celular se tomó una alícuota de 50 μl de la suspensión celular, y se mezcló con el mismo volumen de una solución estéril al 0,4 % de azul Tripán en NaCl 0,15 M. Esta mezcla se depositó sobre la cámara Neubauer y se procedió a su recuento en un microscopio.

La viabilidad celular se evaluó considerando el porcentaje de células no coloreadas (viables) respecto al número total de células. Todos los experimentos con las líneas celulares utilizadas se realizaron partiendo de una viabilidad celular de al menos un 85 %.

3.6.5 Inactivación del complemento en el suero fetal bovino

El suero añadido al medio de cultivo siempre se decomplementó para evitar así la lisis de las células por el sistema del complemento.

Para ello, el suero se incubó durante 30 min a 56°C en baño térmico y transcurrido este tiempo se centrifugó 15 min a 2.000 xg. El sobrenadante se recogió en un tubo de fondo cónico y se congeló hasta su posterior uso.

3.6.6 Generación de OCs a partir de diferentes precursores

Las células de la médula ósea se aislaron de los huesos largos de las extremidades posteriores de ratones de entre 3-4 semanas de edad. Se

incubaron las células extraídas de la médula durante 2 h a 37 °C, para eliminar las células adherentes. Posteriormente, se cultivaron 5×10^5 cel/pocillo de células mononucleares no adherentes en medio α -MEM suplementado con antibióticos y 10 % de SFB, inactivado por calor. Seguidamente, las células se trataron con las concentraciones requeridas de GzmA activa, controles positivos o solo medio (control negativo). El 50 % del medio fue reemplazado en días alternos, hasta el día 6.

Para generar unidades formadoras de colonias de granulocitos/monocitos (CFU-GM), se cultivaron 5×10^4 células no adherentes de médula ósea de ratón, aisladas de ratones wt o TNF- $\alpha^{-/-}$ de 3-4 semanas (Charles Rivers, Maine). Se cultivaron en presencia de metilcelulosa (Sigma) y GM-CSF recombinante (2 ng/ml) (Peprotech), en placas de 35 mm durante 4 días. Después, las células fueron disociadas y se sembraron 10^4 cel/pocillo (en placas de 96 pocillos) para el ensayo de formación de OCs (589).

Para evitar la contaminación con células accesorias, durante la diferenciación de OCs a partir de precursores de la médula ósea, en algunos experimentos se utilizaron células RAW 264.7 como fuente de precursores de OCs. En este caso, una vez que las células alcanzaron la confluencia, se cultivaron a la densidad requerida en placas de 96 pocillos y se les añadieron los estímulos necesarios durante 5-6 días.

Para la medición de la formación de OCs, en los diferentes tipos celulares precursores de OCs, se utilizó el ensayo de la actividad de la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP, del inglés “Tartrate Resistant Acid Phosphatase”). Para ello, las células se fijaron con formalina al 3 % durante 10 min y se incubaron con el kit para la tinción de células TRAP+ (Sigma Chemical Inc. St Louis, MO) durante 1 h. Posteriormente, las células se contra tiñeron con una solución de hematoxilina. Se contaron y midieron el número de OCs multinucleados desarrollados por pocillo, considerando como osteoclastos a las células positivas para TRAP, que tenían más de tres núcleos por célula (589). Como control positivo, las células fueron estimuladas con 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25-D3) (Calbiochem), RANKL (50 ng/ml) (Biotech) y/o M-CSF (25 ng/ml) (Peprotech).

3.6.7 Generación de macrófagos M1 derivados de la médula ósea (BMDM)

Para la obtención de BMDM, se utilizaron ratones de fondo genético C57BL/6 a los que, tras ser sometidos a eutanasia en cámara de CO₂, se les extrajeron las extremidades posteriores. Tras eliminar cuidadosamente la piel y el músculo, se lavaron con etanol al 70 % y DMEM, se cortaron asépticamente los extremos de los huesos, para dejar al descubierto la médula ósea y se eluyeron las células inyectando 5 ml de medio DMEM a través de la cavidad ósea. A continuación, esta suspensión se homogenizó y se filtró mediante un filtro estéril de nylon de 100 µm. Seguidamente se lisaron los eritrocitos y la suspensión se centrifugó a 300 xg durante 5 min.

Las células obtenidas se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con Glutamax, 10 % de SFB, 2 mM de penicilina (100 U/ml) y 2 mM de estreptomicina (100 µg/ml) y con 10 % de sobrenadante de la línea X-63Ag8653 como fuente de GM-CSF (597). Posteriormente, se ajustó la concentración a 1×10^6 cel/ml y se sembraron 10 ml en placas de cultivo estériles de 90 mm. Al tercer día, se eliminó el sobrenadante, las placas se lavaron 2 veces con PBS y se les adicionó 10 ml de medio GM-CSF fresco. Este procedimiento se repitió al sexto día. El noveno día, se eliminó nuevamente el sobrenadante, se lavó dos veces con PBS y se adicionaron 3 ml de tripsina por placa. Tras una incubación de 15 min a 37 °C con 5 % de CO₂, se añadieron 5 ml de medio RPMI suplementado con 5 % de SFB, se recogieron las células en tubos estériles de fondo cónico y se centrifugaron durante 5 min a 300 xg.

Una vez eliminado el sobrenadante, las células se resuspendieron nuevamente en 10 ml de RPMI suplementado con 5 % de SFB, se contaron, se sembraron 5×10^4 cel/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano o 2×10^5 cel/pocillo en placas de 48 pocillos (Costar) y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ para ser utilizadas en los experimentos del día siguiente. Al cabo de 10 días, los macrófagos estaban completamente diferenciados, mostrando un fenotipo CD11b⁺ F4/80⁺, analizado mediante citometría de flujo.

3.6.8 Análisis de la expresión de IL-6 inducida por GzmA extracelular en macrófagos M1

Los macrófagos proinflamatorios M1 se generaron a partir de la médula ósea utilizando el protocolo explicado en el apartado anterior. Al cabo de 7 días, se estimularon con GzmA activa (300 nM) o GzmA inactivada con el inhibidor específico serpinb6b (2,4 μ M) y LPS de *E. coli* (100 ng/ml) (Sigma), como control positivo. Para analizar el papel de la vía NF- κ B en la expresión de IL-6 inducida por GzmA, los macrófagos se trataron con el inhibidor específico de NF- κ B, Celastrol (Sigma), durante 1 h antes de la adición de GzmA. Los macrófagos se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂, transcurrido ese tiempo se recogieron los sobrenadantes y se cuantificaron los niveles de IL-6 mediante ELISA (ver sección 3.2.3.1).

3.6.9 Activación *in vitro* de las vías p-STAT3 y NF κ B en MC-38

Para llevar a cabo este experimento, las células de la línea MC-38 se sembraron (1x10⁶ cel/pocillos) en DMEM suplementado con 10 % (v/v) SFB, L-glutamina 2 mM y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 μ g/ml). Cuando las células se adhirieron, se eliminó el medio y se añadió DMEM sin SFB y se cultivaron durante 16 h a 37 °C al 5 % de CO₂. Posteriormente, se retiró el medio a las células y se añadieron los sobrenadantes de macrófagos sin estimular y previamente estimulados con GzmA recombinante de ratón (300 nM) o 100 ng/ml de LPS. Como control positivo se añadieron 50 ng/ml de IL-6 de ratón (Miltenyi). Las células se lisaron 15 min después de la adición de los estímulos (ver sección 3.2.4.1).

La concentración de proteínas totales se determinó usando Quick StartTM Bradford Protein Assay (ver sección 3.2.2). Posteriormente se realizó un western-blot utilizando los anticuerpos correspondientes para visualizar y cuantificar la expresión de p-STAT3, NF κ B e I κ B α . La cuantificación se realizó por densitometría, con la ayuda del software ImageJ (ver sección 3.2.4.4).

3.7 Determinación de la correlación entre GZMA e inflamación en muestras de CCR humano

Se utilizaron datos de expresión génica de un conjunto de 98 tejidos tumorales de pacientes con CCR (proyecto Colonomics: www.colonomics.org, NCBI BioProject PRJNA188519). Brevemente, el RNA extraído de cada muestra se hibridó en chips Affymetrix Genoma Humano U219 y se analizó bajo el protocolo estándar (598). Tanto los datos sin procesar como los normalizados están disponibles en la base de datos Omnibus de expresión génica (GEO) a través del número de acceso GSE44076. Todos los pacientes estaban en estadio II, MSS, tratados con cirugía radical y no recibieron quimioterapia adyuvante. Fueron reclutados en el Hospital Universitario de Bellvitge (España) entre el año 1998 y 2002, dieron su consentimiento informado por escrito y el Comité de Ética del hospital aprobó el protocolo con la referencia PR074 / 11.

Los datos transcriptómicos se usaron para explorar genes cuya expresión estaba asociada con la expresión de GZMA y GZMB. La correlación de Spearman se calculó para generar una lista de genes clasificados y ordenados por su nivel de co-expresión con ambos genes. Posteriormente, se utilizó el algoritmo GSEA (del inglés, "Gene Set Enrichment analysis") (599) en estas listas clasificadas para identificar el enriquecimiento en vías celulares y funciones específicas.

La correlación de Spearman se calculó para evaluar si existe una relación entre la puntuación inflamatoria y la expresión GZMA/GZMB. El mismo análisis se realizó estratificando las muestras según la clasificación CMSs de las mismas. Los modelos de regresión lineal también se ajustaron para calcular los valores de R^2 y p en cada caso.

Para validar estos resultados, se descargó un conjunto de datos de expresión génica del repositorio de GEO (GSE39582), la cual comprendía 566 muestras humanas de CCR con características clínico-patológicas distintas. Esta base de datos incluye pacientes en estadio 0 a IV, tanto con MSI como MSS, y que recibieron diferentes tratamientos (331). Finalmente, los tumores se

clasificaron en los cuatro subtipos moleculares de consenso, CMS1 a CMS4, usando el paquete clasificador R de CMSs (333).

3.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism. La diferencia entre las medias de las muestras no pareadas se realizó utilizando el ANOVA de dos vías o el ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni o la prueba t-student no pareada. Las curvas de supervivencia se compararon utilizando la prueba de log rank y la prueba de Gehan-Wilcoxon. La incidencia de tumores se analizó utilizando una prueba exacta de Fisher. Los resultados se dan como el intervalo de confianza (p), y se consideran significativos cuando $p < 0.05$. Las réplicas biológicas se consideran como el número de ratones individuales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Artritis inducida por colágeno. Papel de la GzmA en el modelo CIA

4.1.1 Evaluación de la severidad de la enfermedad

Para establecer si la GzmA está directamente involucrada en la AR *in vivo*, en el presente estudio se utilizó un modelo de ratón donde se inducía poliartritis con colágeno de pollo tipo II. Este modelo, conocido como CIA, se llevó a cabo en ratones wt, GzmA^{-/-} o Perf^{-/-}. Los ratones deficientes en GzmA desarrollaron una AR menos severa, con puntuaciones clínicas significativamente más bajas, que los ratones wt (Figura 4.1A), lo que sugiere que la deficiencia de GzmA podría atenuar el desarrollo de CIA. La diferencia entre wt y GzmA^{-/-} se observó en todos los puntos examinados después del inicio de la enfermedad. Los signos clínicos en los ratones deficientes en Perf fueron más leves que en los ratones wt pero más pronunciados que en los deficientes en GzmA, lo que indica que la GzmA tiene acción intracelular y extracelular. La evaluación de la incidencia de la enfermedad demostró que, después de 105 días, aproximadamente el 80 % de los ratones wt y el 60 % de los ratones Perf^{-/-} desarrollaron artritis. En contraste, solo el 30-35 % de los ratones GzmA^{-/-} mostraron signos de enfermedad (Figura 4.1B). En la figura 4.1C se observa que los ratones wt mostraron un mayor número de miembros afectados por artritis en comparación con los ratones deficientes en Perf y GzmA. En conjunto, estos datos indican que GzmA contribuye al desarrollo de la poliartritis en este modelo animal.

Resultados y Discusión

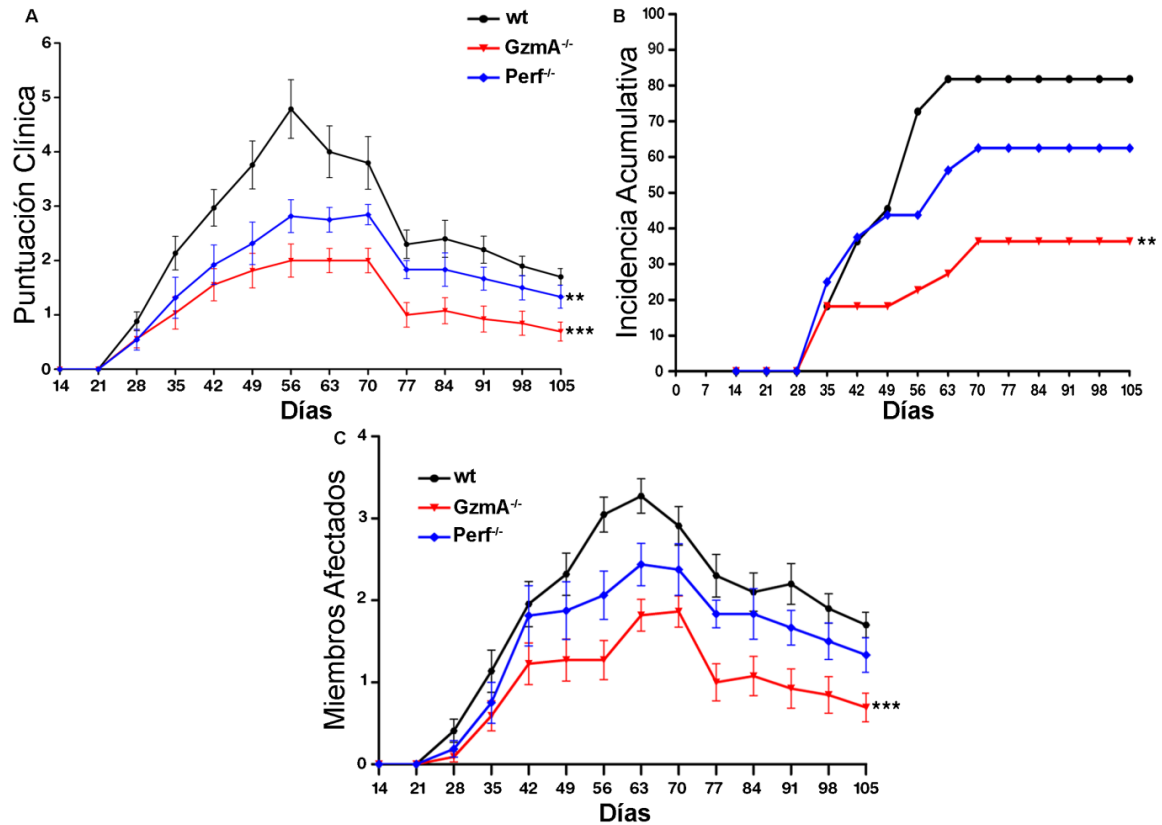


Figura 4.1 La deficiencia de GzmA atenúa la artritis inducida por colágeno *in vivo*. Se inmunizaron ratones hembra wt, GzmA^{-/-} y Perf^{-/-} con colágeno de pollo tipo II, como se describe en los materiales y métodos. Después de la segunda inmunización, el día 21, se estableció una puntuación clínica que se evaluó una vez a la semana, como se indica en los materiales y métodos (A). Además, se monitorizó la incidencia de AR (B) y el número de patas afectadas (C). Los valores se presentan como media \pm SEM de 38 (B6), 23 (Perf^{-/-}) y 33 (GzmA^{-/-}), réplicas biológicas realizadas en 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de dos vías con la prueba posterior de Bonferroni. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, comparando cada grupo con el grupo control (B6).

4.1.2 Estudio de anatomía patológica

Se analizó la histopatología articular mediante tinción de hematoxilina y eosina. La lesión tisular se examinó 6 semanas después del inicio de la enfermedad, momento en el que la severidad fue macroscópicamente máxima. Se estableció una puntuación para la inflamación, la pérdida de cartílago, la erosión ósea y la hiperplasia sinovial. El daño histológico total se redujo significativamente en las patas y rodillas de los ratones GzmA^{-/-} (Figura 4.2).

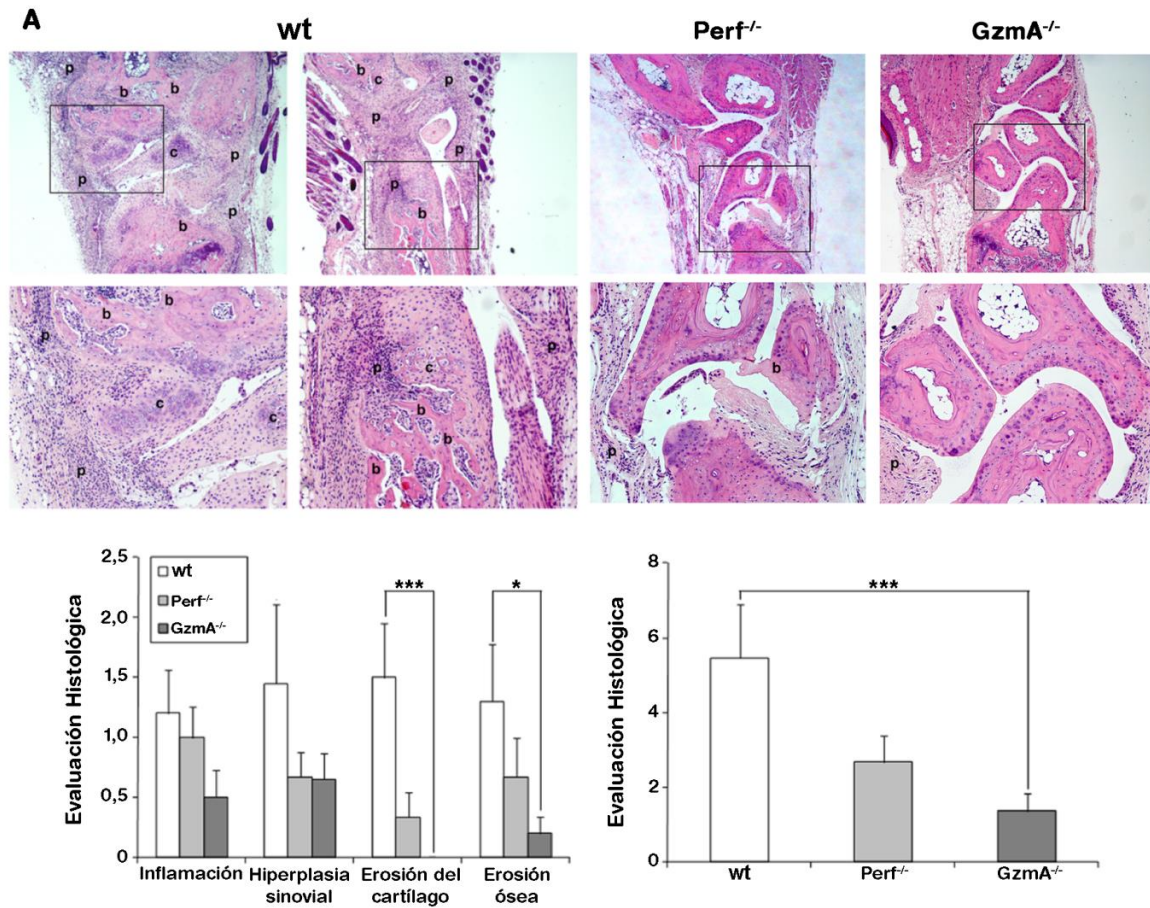


Figura 4.2A Puntuaciones histológicas reducidas en las patas de ratones GzmA^{-/-}. Se inmunizaron ratones hembra wt, ratones Perf^{-/-} y ratones GzmA^{-/-} con colágeno de pollo tipo II, como se describe en los materiales y métodos. Se sacrificaron los animales 6 semanas después del inicio de la enfermedad y se recogieron las patas para el análisis histológico. En la figura se muestran imágenes representativas de las patas delanteras de los 3 grupos experimentales. Las áreas encerradas en cuadrados se muestran con un aumento mayor en la parte inferior de cada fotografía. p = pannus; b = erosión ósea; c = erosión del cartilago. Ampliación original X 10. La puntuación para cada parámetro histológico (a la izquierda) y la puntuación total en cada grupo de ratones (a la derecha) se determinaron como se describe en materiales y métodos. Los valores se presentan como la media \pm SEM de 5 (B6), 3 (Perf^{-/-}) y 5 (GzmA^{-/-}), réplicas realizadas en 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

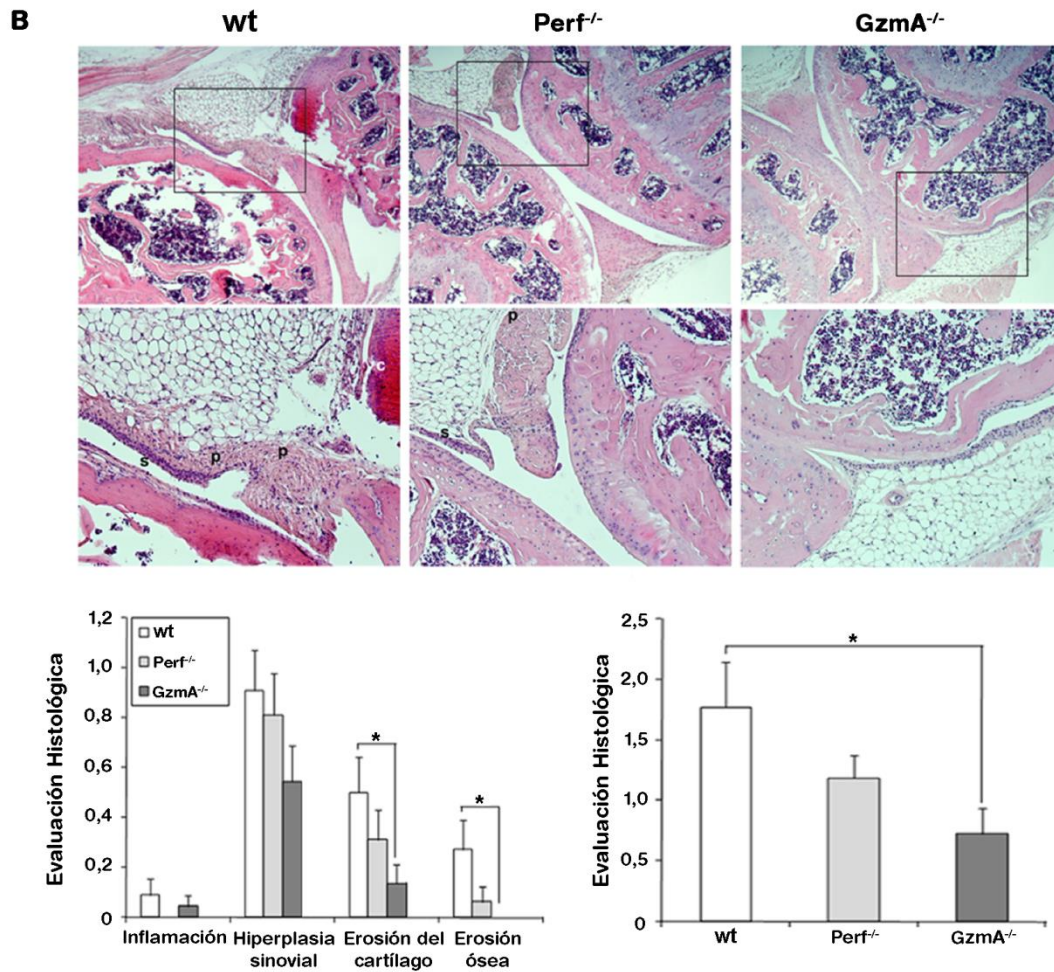


Figura 4.2B Puntuaciones histológicas reducidas en las rodillas de ratones GzmA^{-/-}. Se inmunizaron ratones hembra wt, ratones Perf^{-/-} y ratones GzmA^{-/-} con colágeno de pollo tipo II, como se describe en los materiales y métodos. Se sacrificaron los animales 6 semanas después del inicio de la enfermedad y se recogieron las rodillas para el análisis histológico. En la figura se muestran imágenes representativas de las rodillas de los 3 grupos experimentales. Las áreas encerradas en cuadrados se muestran con un aumento mayor en la parte inferior de cada fotografía. p = pannus. Ampliación original X 10. La puntuación para cada parámetro histológico (a la izquierda) y la puntuación total en cada grupo de ratones (a la derecha) se determinaron como se describe en materiales y métodos. Los valores se presentan como la media \pm SEM de 10 réplicas biológicas de cada cepa (que representan el número de ratones individuales), realizadas en 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. * p < 0,05.

Respalando los datos observados a nivel macroscópico, se encontró reducción del daño a nivel tisular en ratones Perf^{-/-} con respecto a los wt, pero este daño fue mayor al compararlos con los GzmA^{-/-}. Como se distingue en las fotografías representativas (Figura 4.2A-B), las patas y rodillas de ratones wt mostraron una pérdida sustancial de cartílago, erosiones óseas y formación de pannus. En comparación, las patas y rodillas de los ratones GzmA^{-/-} parecían

casi normales y solo presentaban una leve formación de pannus. Por otro lado, se observó que las articulaciones de los ratones $\text{Perf}^{-/-}$ mostraban cierto grado de reabsorción ósea y formación de pannus. El análisis de las articulaciones de las patas y rodillas indicó claramente que las articulaciones de los ratones $\text{Perf}^{-/-}$ estaban más afectadas que las de los ratones $\text{GzmA}^{-/-}$. Es notable resaltar que, la erosión ósea y cartilaginosa estaban prácticamente ausente en los ratones $\text{GzmA}^{-/-}$, lo que sugiere que la actividad de los osteoclastos, células responsables de la reabsorción ósea, podría reducirse en ausencia de GzmA .

4.1.3 Respuesta inflamatoria *in vivo* durante CIA

La AR es una enfermedad autoinmune, crónica y de carácter inflamatorio, que se caracteriza por la destrucción de cartílago y el hueso (600), proceso en el cual juegan un papel primordial las citoquinas proinflamatorias.

Para analizar la respuesta inflamatoria, *in vivo*, frente al colágeno Tipo II en este modelo de AR, se cuantificaron los niveles de las citoquinas $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e IL-17A, en el suero de ratones wt y $\text{GzmA}^{-/-}$. Como se observa en la figura 4.3, todas las citoquinas analizadas aumentaron significativamente en animales wt inmunizados en comparación con sus controles no tratados, tanto en las etapas tempranas como en las más tardías de la enfermedad. Con respecto a los ratones deficientes en GzmA se observó que no hubo aumento de la producción de las citoquinas IL-6 e IL-17A, al comparar los animales inmunizados con respecto a sus ratones control no tratados.

A comparar ambas cepas comprobamos que, las citoquinas $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 se redujeron significativamente en ratones $\text{GzmA}^{-/-}$ con respecto a los ratones wt tratados, tanto en la fase temprana como en la tardía de la enfermedad, con la excepción de $\text{IFN-}\gamma$, donde solo se observó este comportamiento al inicio de la AR. Con respecto a IL-17A, no hubo diferencias significativas entre ambas cepas, aunque cabe enfatizar en el hecho de que la citoquina se elevó significativamente en los ratones wt pero no en los ratones $\text{GzmA}^{-/-}$, cuando se compararon los inmunizados con respecto a sus respectivos ratones control no tratados.

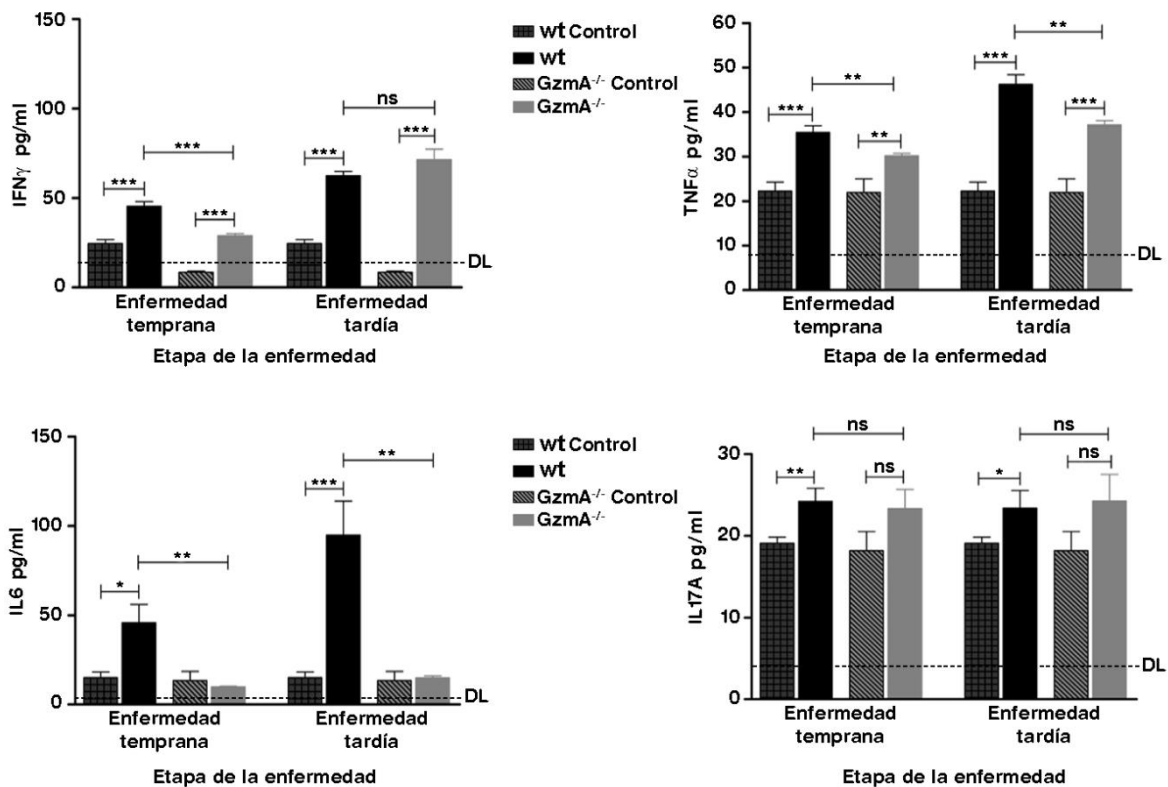


Figura 4.3 Niveles de citoquinas inflamatorias en sueros de ratones con CIA. Se inmunizaron ratones hembra wt y ratones deficientes en GzmA con colágeno de pollo tipo II, como se describe en materiales y métodos. Se sacrificaron 2 (enfermedad temprana) o 6 (enfermedad tardía) semanas después del inicio de la CIA. Se recolectaron los sueros de los ratones y se cuantificaron por ELISA los niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-17A. Los valores se presentan como media \pm SEM de al menos 10 réplicas biológicas realizadas en 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; LD = Límite de detección; NS = no es significativo.

4.1.4 Expresión de GzmA durante CIA

Se ha encontrado aumento de células que expresan GzmA en el tejido y el líquido sinovial durante las primeras etapas de la enfermedad (601, 602). También se han encontrado niveles elevados de GzmA en el plasma y en el líquido sinovial de los pacientes con AR (111, 603-605).

Para evaluar los niveles extracelulares de GzmA en el lisado de proteínas totales de las articulaciones y en el suero de ratones wt con CIA, se realizó un ELISA de GzmA (ver sección 3.2.3.2). Como se observa en la figura 4.4A, los niveles de GzmA aumentaron significativamente durante CIA en el suero de ratones wt, al compararlos con sus ratones control sanos, tanto en las etapas

iniciales como en las tardías de la enfermedad. La GzmA también se elevó en las articulaciones de ratones CIA (Figura 4.4B). Estos datos confirmaron que, tal como ocurre en los seres humanos, los niveles de GzmA están elevados en el suero y en las articulaciones de ratones que padecen AR. Como se esperaba, no se detectó GzmA en el suero de ratones GzmA^{-/-}.

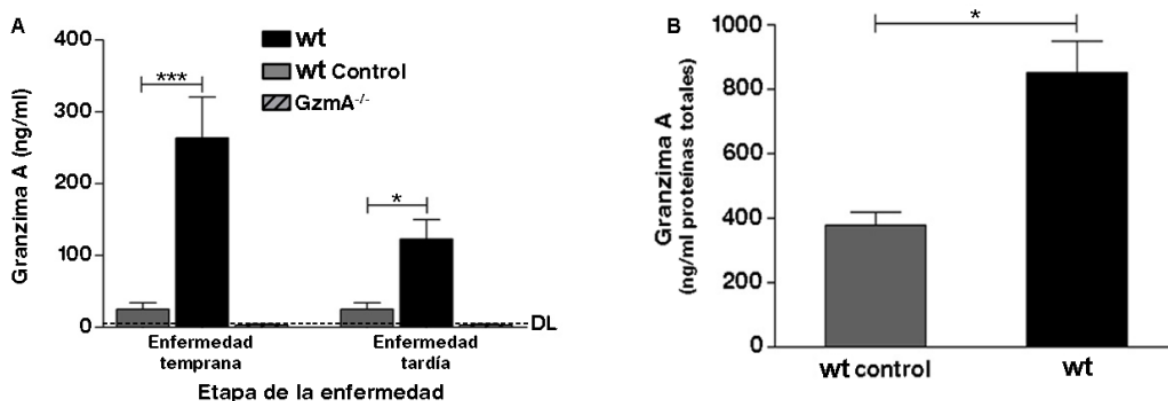


Figura 4.4 Niveles de GzmA en suero y articulaciones de ratones con CIA. Se inmunizaron ratones hembra wt con colágeno de pollo tipo II, como se describe en materiales y métodos. Se sacrificaron 2 (enfermedad temprana) o 6 (enfermedad tardía) semanas después del inicio de la AR. Se cuantificaron los niveles de GzmA en suero (A) y en las articulaciones (B). Los niveles de GzmA en las articulaciones se muestran como la concentración (ng/ml) por mg de proteínas totales presentes en el lisado. Los valores se presentan como media \pm SEM de al menos 7 réplicas biológicas realizadas en 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student no pareado. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; LD = Límite de detección.

4.1.5 Respuesta *in vivo* de células B al colágeno tipo II:

Paralelamente al estudio de la producción de citoquinas en el suero, se evaluó el desarrollo de la enfermedad detectando la generación de anticuerpos específicos contra el colágeno tipo II. En base a los conocimientos actuales, es evidente que los linfocitos B, además de actuar como APCs, participan activamente en la sinovitis característica de la AR mediante la producción de autoanticuerpos, mayoritariamente Ig de tipo G (237, 606, 607).

Como se muestra en la figura 4.5A, los niveles de IgG específica frente a colágeno aumentaron significativamente en ratones wt inmunizados, así como en ratones GzmA^{-/-}. Sin embargo, los niveles de IgG fueron significativamente más bajos en ausencia de GzmA, en las etapas iniciales y tardías de la enfermedad, lo que sugiere que la generación de una respuesta de células B, que conduce a

la producción de anticuerpos autorreactivos frente al colágeno, está regulada por la presencia de GzmA.

Cuando se realizó el estudio de los distintos isotipos de IgG que participan en el proceso artrítico se observó que los niveles de IgG1 e IgG2c se redujeron en ausencia de GzmA (Figura 4.5B).

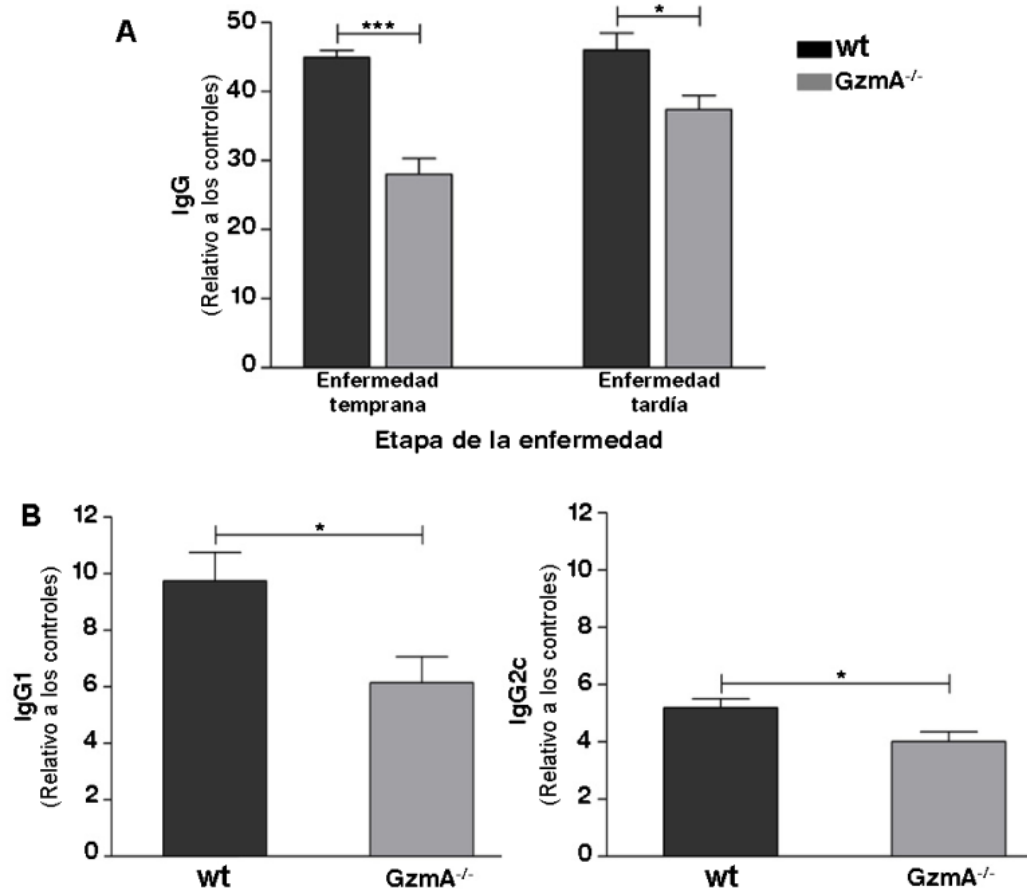


Figura 4.5 Respuestas de las células B durante CIA. Se inmunizaron ratones hembra wt y ratones deficientes en GzmA con colágeno de pollo tipo II, como se describe en materiales y métodos. Se sacrificaron 2 (enfermedad temprana) o 6 (enfermedad tardía) semanas después del inicio de la CIA. Los sueros fueron recolectados y se cuantificaron los niveles de IgG total específica frente a colágeno (A) y de los isotipos IgG1 e IgG2c (B). Los valores se presentan como media \pm SEM de al menos 7 réplicas biológicas realizadas en 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student no pareado. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.1.6 Respuesta *in vitro* de células T al colágeno tipo II

La activación de los linfocitos T desencadena múltiples efectos como la proliferación de células sinoviales y endoteliales, el reclutamiento de otras células pro-inflamatorias presentes en la circulación sanguínea y, también

favorecen la producción de autoanticuerpos por los linfocitos B. Los linfocitos T constituyen el 50 % de las células presentes en la membrana sinovial de pacientes con AR, la mayoría de ellos T CD4⁺ (244, 257). Así, una vez evaluada la respuesta de células B detectando la generación de anticuerpos específicos contra el colágeno tipo II, se evaluó la respuesta *in vitro* de células T.

La presencia de células T reactivas frente al colágeno tipo II se determinó monitorizando la proliferación celular, a través de la incorporación de ³H-Timidina y también monitorizando la producción de IFN- γ en el sobrenadantes de células de ganglios linfáticos, procesadas y estimuladas como se indica en los materiales y métodos. Las células de las diversas cepas proliferaron de manera similar, lo que sugiere que la protección observada, conferida por la falta de GzmA y Perf, no se debe a la generación de células T menos autorreactivas (Figura 4.6). Además, no hubo diferencias significativas en cuanto a la producción de IFN- γ en el sobrenadantes de células de ganglios linfáticos estimuladas con diferentes concentraciones de CII (Figura 4.7), lo que confirma que el estado de activación de las células fue similar después de la estimulación con el antígeno, indicando que la eficacia de inmunización fue similar en las diferentes cepas utilizadas en los experimentos.

También se cuantificaron otras citoquinas en el sobrenadante del cultivo de células de ganglios linfáticos, estimuladas con diferentes concentraciones de colágeno. Como se observa en la figura 4.7 el TNF- α y la IL-17A estaban significativamente elevados en wt en comparación con los ratones GzmA^{-/-}. Cabe señalar que, como era de esperar, no se detectó producción de IL-1 β ni IL-6 en células de ganglios linfáticos de ratones estimuladas *ex vivo*.

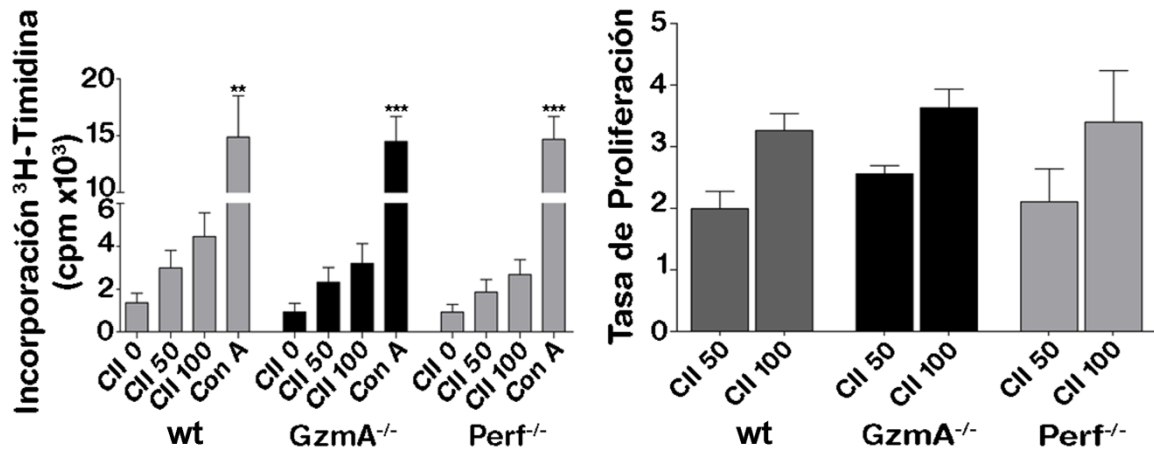


Figura 4.6 Respuestas de células T autorreactivas durante la CIA. Se inmunizaron ratones hembra wt, GzmA^{-/-} y Perf^{-/-} con colágeno de pollo tipo II, como se describe en los materiales y métodos. Los ratones se sacrificaron 2 semanas después del inicio de la enfermedad y se extrajeron los ganglios linfáticos. Las células derivadas de ganglios linfáticos se incubaron en medio solo (CII 0) o con 50 o 100 µg/ml de colágeno de pollo tipo II durante 72 horas. Como control positivo se utilizó concanavalina A (Con A). Se analizó la cantidad de ³H-Timidina incorporada (izquierda) y la tasa de proliferación (derecha). Los valores se presentan como media ± SEM de al menos 10 réplicas biológicas realizadas en 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. ** p < 0,01; *** p < 0,001.

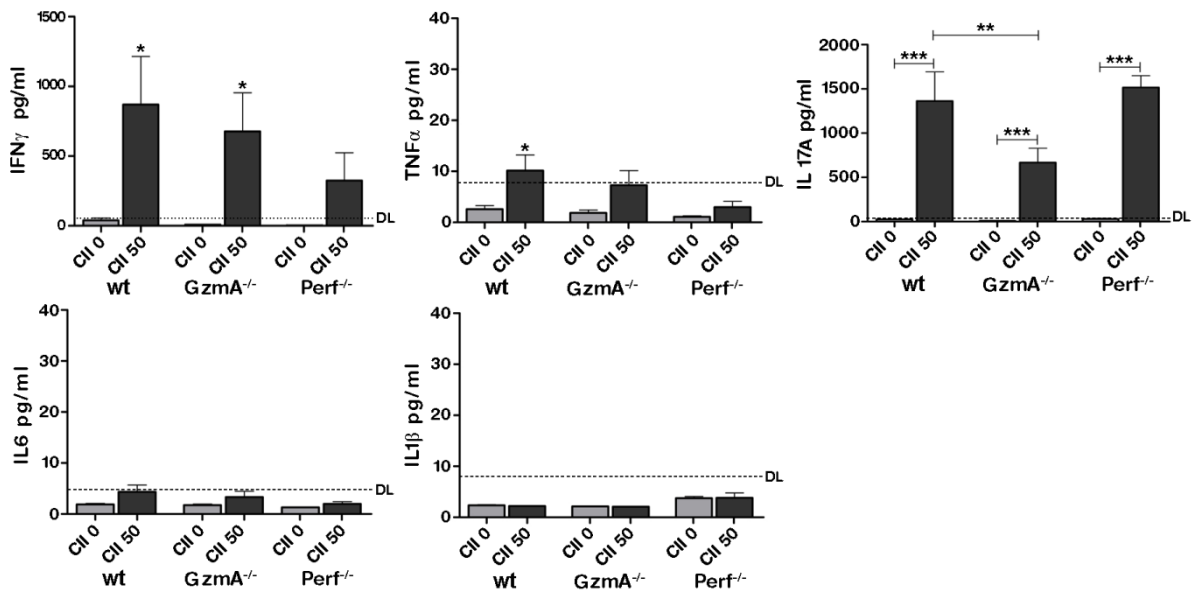


Figura 4.7 Producción de citoquinas en cultivos de ganglios linfáticos *in vitro*. Se inmunizaron ratones hembra wt y GzmA^{-/-} con colágeno de pollo tipo II, como se describe en los materiales y métodos. Los ratones se sacrificaron 2 semanas después del inicio de la enfermedad, los ganglios linfáticos se extrajeron e incubaron en medio solo (CII 0) o con 50 µg/ml de colágeno de pollo tipo II durante 72 horas. Posteriormente, el nivel de citoquinas en el sobrenadante de cultivos de ganglios se cuantificó mediante ELISA. Los valores se presentan como media ± SEM de al menos 10 réplicas biológicas realizadas en 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student no pareado. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; LD = Límite de detección.

4.1.7 Estudio de la osteoclastogénesis *in vivo* durante CIA

Los OCs, células primarias que reabsorben los huesos, son de origen hematopoyético y de la familia de monocitos/macrófagos. La formación y activación de los OCs está estrechamente reguladas por factores sistémicos (por ejemplo, 1,25-dihidroxitamina D3, hormona paratiroidea y calcitonina) y por factores pericelulares, incluidas las citoquinas como el TNF- α y TGF- β (608, 609). Aunque la reabsorción los huesos es un proceso esencial durante la remodelación ósea, el aumento de la actividad de los OCs contribuye a numerosos estados patológicos, como la osteoporosis, la enfermedad de Paget, las metástasis óseas y la AR (610).

Según los resultados ya expuestos, la erosión ósea y cartilaginosa estaban prácticamente ausentes en los ratones deficientes en GzmA (ver Figura 4.2A-B), evidencia que sugería que la actividad de los osteoclastos podría reducirse en ausencia de GzmA. Por lo tanto, se decidió analizar el efecto de la ausencia de GzmA en la diferenciación de OCs *in vivo*, evaluando la expresión y la actividad de los OCs en ratones wt y ratones GzmA^{-/-}.

Primeramente se realizó una tinción inmunohistoquímica en secciones de tejido de articulaciones de ratones con CIA, utilizando un anticuerpo contra el receptor de calcitonina. Se contaron y midieron los OCs, los cuales se definieron como células multinucleadas positivas para el receptor de calcitonina. Como se muestra en la figura 4.8A, se encontraron células multinucleadas que expresaban el receptor de calcitonina en las fosas de la superficie ósea (bahías de reabsorción), lo que indica que estas células son OCs. El número de OCs y el área total de OCs (pero no el tamaño de los OCs individuales) fue significativamente menor en los ratones GzmA^{-/-} en comparación con los ratones wt, lo que indica que GzmA también contribuye a la diferenciación de OCs *in vivo* (Figura 4.8B).

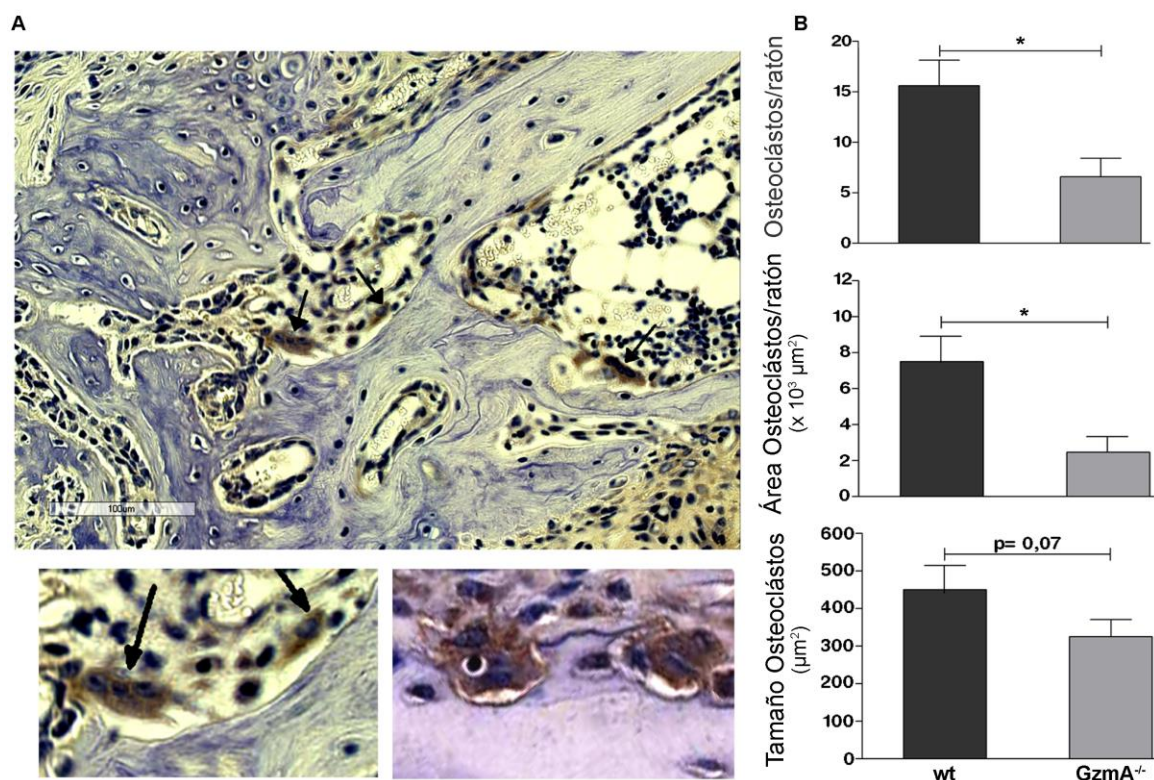


Figura 4.8A-B Expresión reducida de osteoclastos (OCs) en ausencia de GzmA en ratones con CIA. Se inmunizaron ratones hembra wt y GzmA^{-/-} con colágeno de pollo tipo II, como se describe en los materiales y métodos. Se sacrificaron 7 semanas después de la aparición de la enfermedad. A, ensayo de inmunohistoquímica para el receptor de calcitonina en ratones wt. Las fotografías son representativas de una sección de la pata de un ratón wt. Se consideraron OCs toda célula multinucleada positiva para el receptor de calcitonina, localizadas en los hoyos de la superficie del hueso (flechas). Las imágenes en la parte inferior son fotografías de mayor aumento de los hoyos de reabsorción, que se muestran en la imagen superior, observándose 2 osteoclastos en cada imagen. Ampliación original X 10. B, números de OCs totales, área de superficie de OCs (suma de OCs en una sección de ambas patas delanteras) y el tamaño de los OCs individuales. Los valores se presentan como media \pm SEM de al menos 5 réplicas biológicas.

Estos datos se confirmaron al cuantificar la expresión de mRNA de marcadores específicos de OCs, como la catepsina K, MMP-9 y TRAP. La figura 4.8C muestra que todos estos marcadores se redujeron claramente en ratones GzmA^{-/-} en comparación con los ratones wt, a pesar de que la diferencia en los niveles de catepsina K no tuvieron significación estadística. También se evaluó la expresión del receptor de calcitonina y la β 3-integrina. Aunque estos niveles también fueron más bajos en los ratones GzmA^{-/-}, en comparación con los wt, la expresión en ambas cepas fue muy baja y las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Para confirmar aún más que la deficiencia de GzmA redujo la actividad de OCs *in vivo*, cuantificamos en suero los niveles uno de los productos de degradación del colágeno tipo I, el telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (ICTP) (Figura 4.8D). La matriz orgánica del hueso está constituida por colágeno tipo I en un 90 %. Durante el proceso de degradación ósea se liberan péptidos de los extremos carboxi y amino terminal de las moléculas de protocolágeno, que son los que pasan al torrente sanguíneo y pueden ser detectados (611). Como se pudo apreciar, la concentración de ICTP fue significativamente más baja en ratones GzmA^{-/-} que en ratones wt. En conjunto, estos datos confirman que la GzmA participa en la osteoclastogénesis *in vivo* durante la artritis inflamatoria.

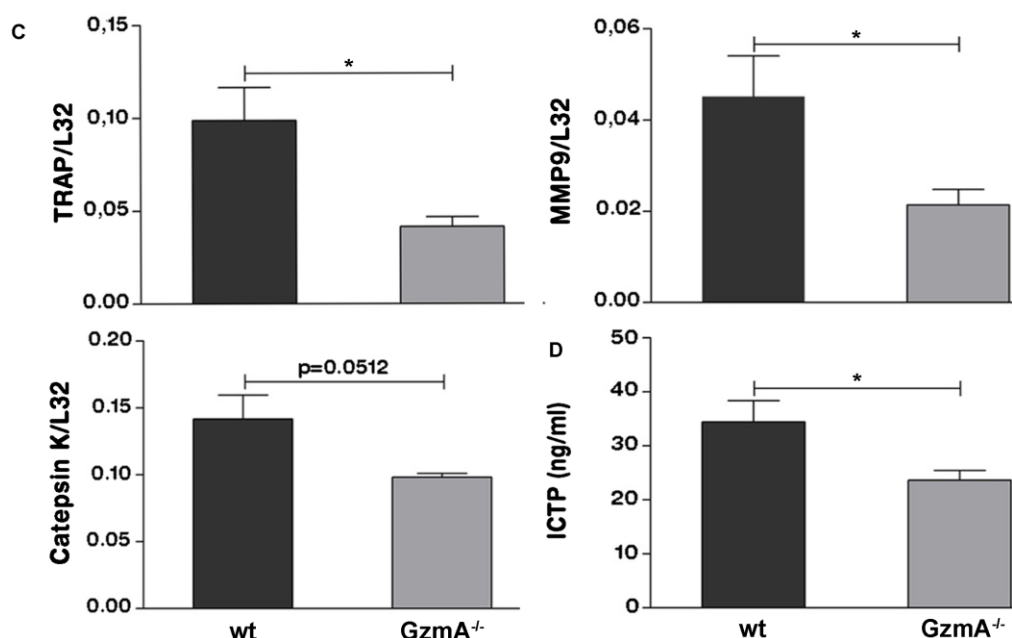


Figura 4.8C-D Expresión reducida de osteoclastos (OCs) en ausencia de GzmA en ratones con CIA. Se inmunizaron ratones hembra wt y GzmA^{-/-} con colágeno de pollo tipo II, como se describe en los materiales y métodos. Se sacrificaron 7 semanas después de la aparición de la enfermedad. Las patas delanteras fueron extraídas y procesadas. C, expresión del mRNA para TRAP, MMP-9 y catepsina-K en ratones wt y ratones GzmA^{-/-}. Los resultados se expresan en relación al mRNA de la proteína ribosomal mitocondrial L32 (control). D, niveles séricos del producto de degradación ósea telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (ICTP). Los valores se presentan como media \pm SEM de al menos 5 réplicas biológicas. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student no pareado. * p <0,05.

4.1.8 Estudio de la osteoclastogénesis *in vitro*

Todos los estudios *in vitro* que se presentan en este trabajo se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr. Christopher J. Froelich (ya fallecido), en la universidad de North Shore, Evanston, Illinois, Estados Unidos de América.

Como el estudio histológico sugirió que la actividad de los osteoclastos podría estar reducida en ausencia de GzmA, se decidió analizar si la proteasa era capaz de estimular la diferenciación de osteoclastos a partir de células de la médula ósea. Para determinar si la GzmA induce la formación de OCs *in vitro*, se incubaron células de médula ósea de ratón, no adherentes, como fuente de precursores de OCs, durante 6 días con concentraciones crecientes de GzmA (0.01–7.5 µg/ml) y se realizaron varios ensayos.

Primeramente se realizó la tinción para TRAP y se demostró que aumentaban las células multinucleadas TRAP+ al añadir GzmA al cultivo, de manera dependiente de la dosis, lo que sugiere que la proteasa podría tener la capacidad de estimular directamente la maduración de OCs (Figura 4.9A-B).

A continuación, se comparó la capacidad de la GzmA para madurar los OCs con la de los inductores conocidos de la osteoclastogénesis: RANKL y 1,25-dihidroxitamina D3. Se compararon la actividad de los 3 inductores durante 6 días, después de determinar la concentración óptima de GzmA (3,5 µg/ml), RANKL y 1,25-dihidroxitamina D3. Se comprobó que aunque la GzmA fue claramente menos potente que RANKL, la proteasa superó la actividad osteoclastogénica de la 1,25-dihidroxitamina D3 (Figura 4.10A).

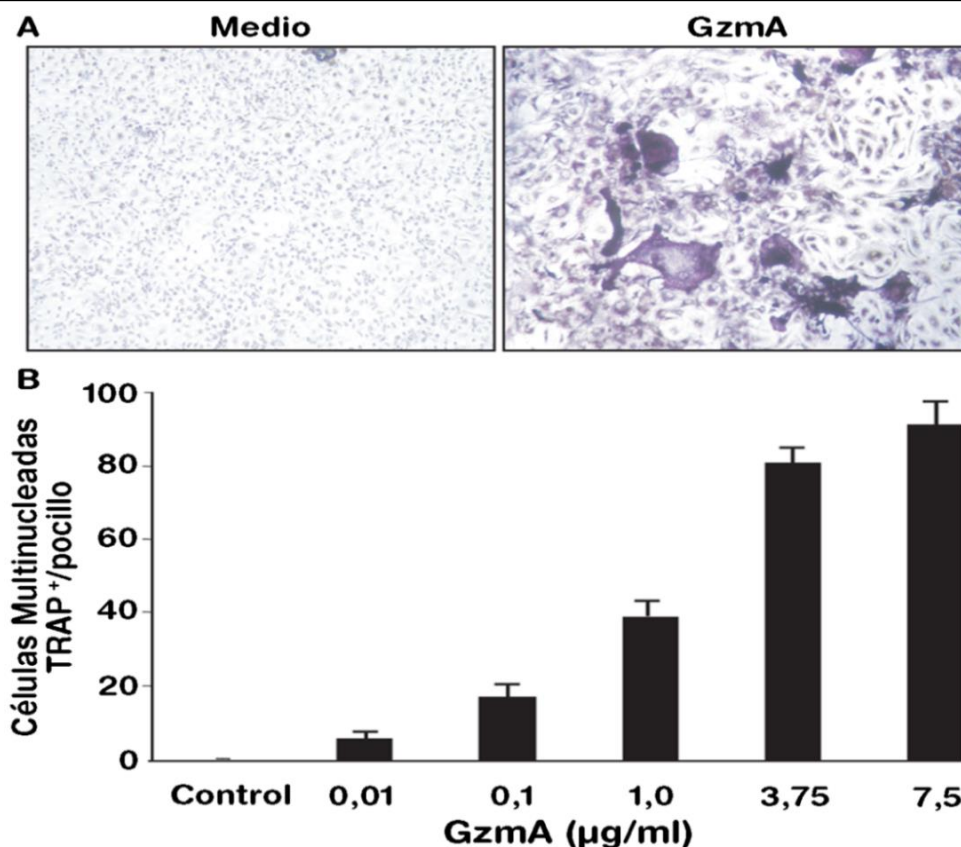


Figura 4.1.9 La Gzma induce la formación de OCs en células no adherentes de médula ósea de ratón. A, Fotomicrografías de células de médula ósea no adherentes tratadas durante 6 días con medio o Gzma (3,5 µg/ml) y teñidas con fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). Las células multinucleadas teñidas con TRAP representan OCs maduros. Ampliación original x 10. B, Curva de concentración de Gzma para células multinucleadas TRAP+. Los valores se representan como la media \pm SEM del número de células TRAP+ multinucleadas en 4 experimentos independientes.

La capacidad de Gzma para inducir la diferenciación y maduración de OCs se confirmó utilizando otro modelo con células precursoras de OCs diferentes. Para estos experimentos se usaron células de la médula ósea de ratón diferenciadas con GM-CSF. Estas células se conocen como células CFU-GM (del inglés, "Colony-Forming Unit-Granulocyte, Monocyte"). Para estudiar la diferenciación de células CFU-GM en OCs maduros, inducida por Gzma, se analizó la expresión de la proteína de adhesión β 3-integrina y el receptor de calcitonina, así como la capacidad para reabsorber hueso en la dentina de ballena. Se comprobó que las células CFU-GM diferenciadas con Gzma, también eran TRAP+, además expresaban mRNA para la β 3-integrina y para el receptor de calcitonina, lo que se determinó mediante RT-PCR semicuantitativa (Figura 4.10 B-C).

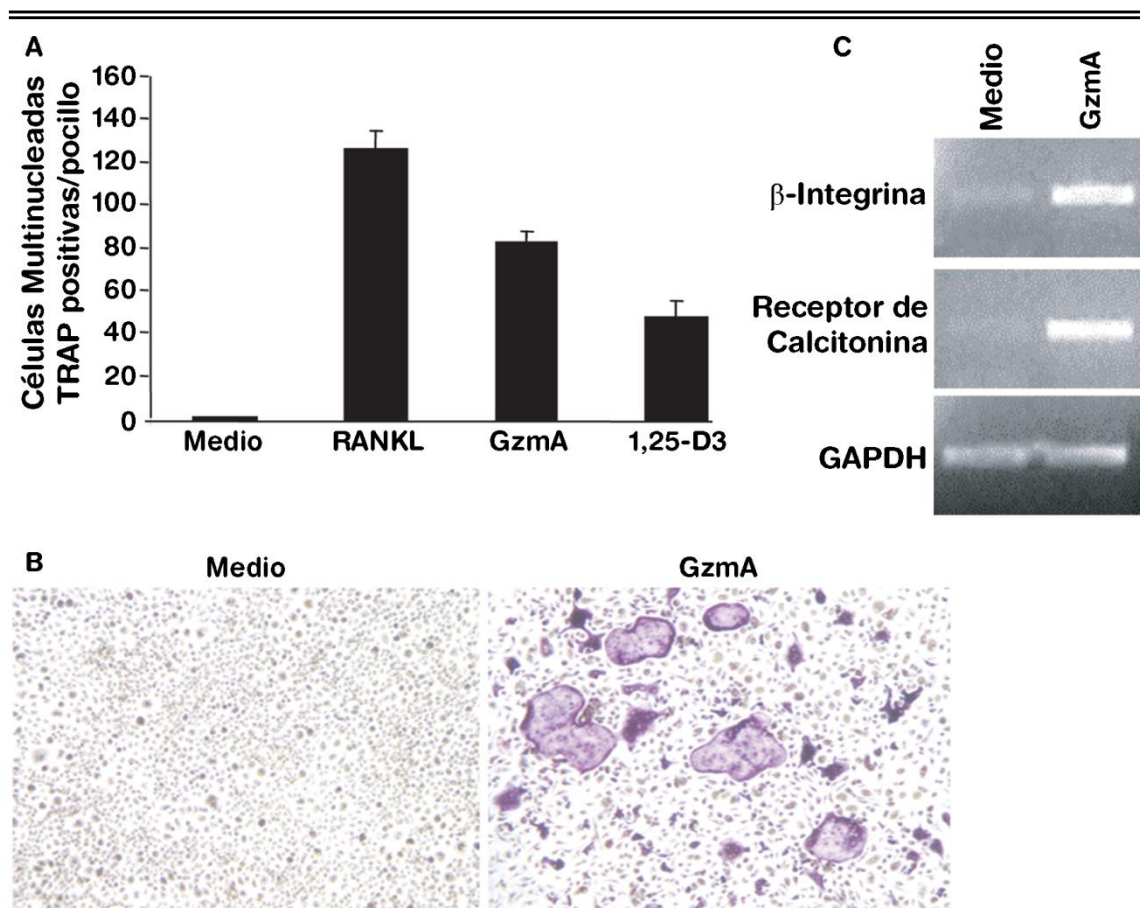


Figura 4.1.10 La GzmA induce la formación de OCs en CFU-GM. A, Comparación del número de células multinucleadas TRAP+ después del tratamiento con medio solo, RANKL, GzmA o 1,25-dihidroxivitamina D3 (1,25-D3). Los valores se representan como la media \pm SEM del número de células TRAP+ multinucleadas en 3 experimentos independientes. B, Comparación entre GzmA y medio solo para inducir la formación de células multinucleadas TRAP+ a partir de precursores de CFU-GM. Las células se tiñeron con TRAP después de 6 días de cultivo. Ampliación original $\times 10$. C, Expresión de mRNA para $\beta 3$ -integrina y el receptor de calcitonina en células CFU-GM estimuladas con GzmA (3,5 μ g/ml) o medio solo. Los resultados se expresan en relación al mRNA de GAPDH (control).

Por otro lado, se constató que cuando las células multinucleadas, estimuladas con GzmA, se retiraron de los discos de dentina de ballena, después de 15 días de cultivo, en la superficie subyacente a estas células hubo formación de un hoyo de resorción (Figura 4.11). Por lo tanto, teniendo en cuenta los 4 criterios aceptados y utilizados para identificar los OCs maduros (células TRAP+, expresión de $\beta 3$ -integrina y del receptor de calcitonina, y capacidad de resorción), la GzmA parece estimular a las células CFU-GM a convertirse en OCs maduros y funcionales. Cabe señalar que la GzmA utilizada en estos estudios, se purificó mediante el uso de cromatografía de intercambio catiónico y fue sometida a un proceso para eliminar las endotoxinas residuales

(utilizando columnas de EndoTrap^R Blue), eliminando cualquier posible efecto de la endotoxina en la formación de OCs.

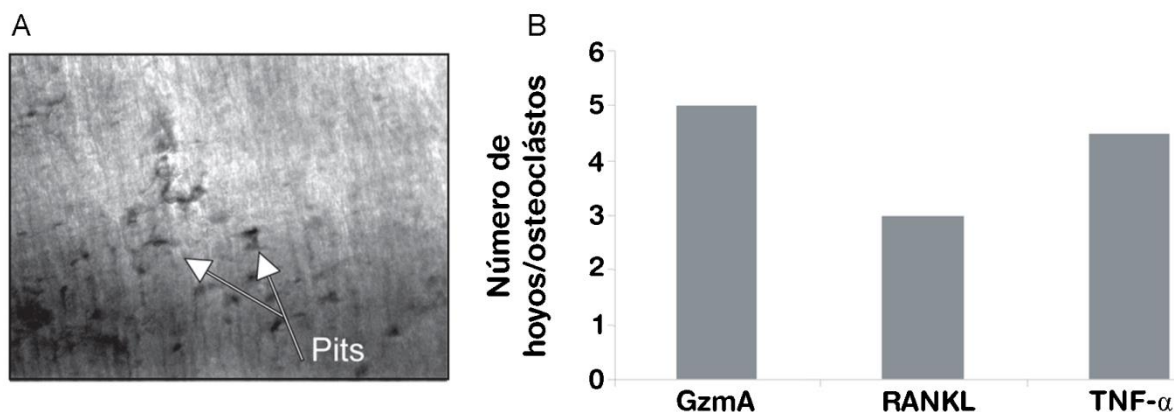


Figura 4.11 La granzima A (GzmA) induce la reabsorción ósea en células CFU-GM. A, Células CFU-GM altamente enriquecidas se cultivaron durante 15 días en rodajas de dentina de ballena en presencia de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF; 25 ng/ml) y GzmA (3,5 µg/ml) o M-CSF solo. Luego se separaron las células y se examinaron los espacios reabsorbidos subyacentes (fosas de reabsorción [flechas]) mediante microscopía de confocal. Ampliación original x 10. B, Los huesos de dentina de ballena se cultivaron como en A, pero esta vez en presencia de RANKL, GzmA y TNF-α, y se cuantificó el número de fosas de reabsorción.

Para saber si la vía de señalización RANK/RANKL influyó en la actividad osteoclastogénica atribuida a la GzmA, según los resultados previos, se realizó un experimento donde las células no adherentes de médula ósea de ratón o las células CFU-GM se estimularon con 3,5 µg/ml de GzmA en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de OPG, el receptor señuelo para RANKL. La actividad inhibitoria de la OPG se verificó utilizando como control positivo células de la médula ósea estimuladas con M-CSF y RANKL. Se comprobó que ninguna de las concentraciones OPG, con las que se bloqueaba el potencial osteoclastogénico de RANKL exógeno, inhibía la capacidad de la GzmA para inducir la formación de OCs TRAP⁺ (Figura 4.12A). Con el objetivo de asegurar que las células de la médula ósea, utilizadas como precursores de OCs, no fueran influenciadas por la actividad del RANKL, probablemente liberado durante la manipulación de dichas célula, éstas se aislaron en presencia y ausencia de OPG (100 ng/ml), se incubaron con GzmA y se realizó la tinción de TRAP, después de 6 días. En presencia de OPG, la GzmA produjo una media \pm SEM de $83,4 \pm 4,7$ células TRAP⁺/pocillos, en comparación con 98 ± 7 células TRAP⁺/pocillo, para células preparadas en ausencia de OPG (resultados

obtenidos en 2 experimentos independientes). En conjunto, todos estos resultados sugieren que la GzmA induce la formación y maduración de OCs por un mecanismo que no se ve afectado por la OPG.

Además, para determinar si el efecto de la GzmA, en la diferenciación a OCs a partir de los precursores de médula ósea de ratón, se producía estimulando directamente los precursores o activando las células accesorias, que luego facilitarían la maduración de las precursoras, se llevó a cabo un experimento donde células CFU-GM, cultivadas en presencia de 100 ng/ml de OPG, se expusieron a M-CSF (25 ng/ml) con medio o con GzmA (3,5 µg/ml) durante 6 días. Las células también se incubaron con RANKL (100 ng/ml) y M-CSF como control positivo. La tinción TRAP de las células CFU-GM incubadas con GzmA demostró que ésta proteasa indujo la formación de OCs totalmente diferenciados, mientras que el M-CSF solo fue ineficaz (Figura 4.12B). Estos resultados apoyan aún más el concepto de que GzmA actúa directamente sobre los precursores de OCs para inducir su maduración y que el receptor señuelo de RANKL, la OPG, no inhibe el proceso.

Se realizó un experimento adicional para evaluar el tamaño de los OCs diferenciados con RANKL o con GzmA. Nuevamente, se encontró un número similar de OCs multinucleados TRAP+ después de la incubación con RANKL o GzmA (Figura 4.12C). Los OCs diferenciados con GzmA fueron significativamente más pequeños que los diferenciados con RANKL, lo que sugiere que, *in vitro*, los OCs diferenciados en presencia de GzmA son morfológicamente diferentes de los inducidos por RANKL.

Sin embargo, como se describió anteriormente, las células diferenciadas con GzmA cumplen todos los criterios aceptados para los OCs maduros: reactividad de TRAP, expresión de receptor de la β 3-integrina y calcitonina, y capacidad de resorción ósea.

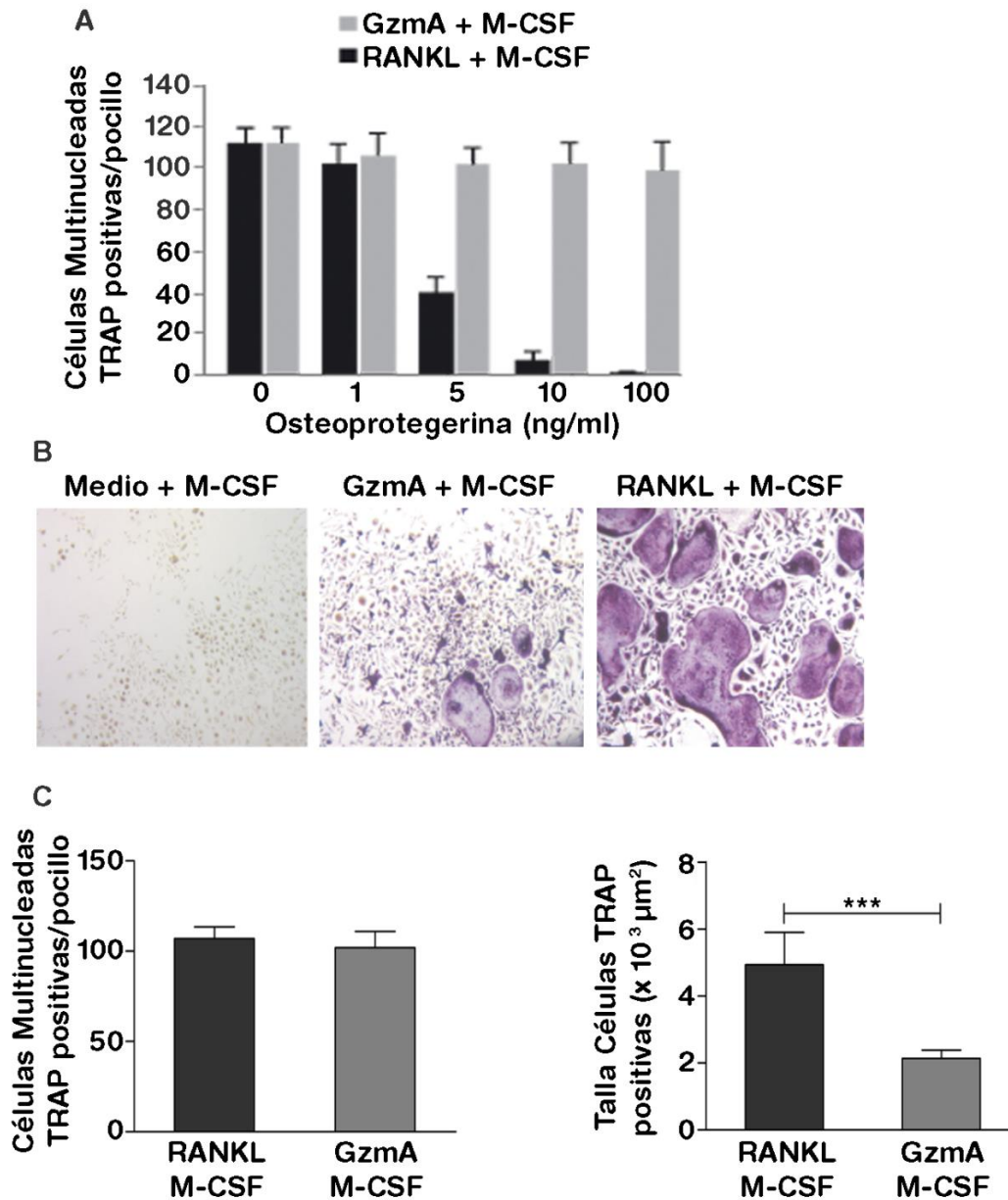


Figura 4.1.12 La OPG no evita la formación de OCs inducida por GzmA. A, Células no adherentes de la médula ósea de ratón se trataron, durante 6 días, con GzmA (3,5 µg/ml) y M-CSF (25 ng/ml) en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de OPG recombinante. Se cuantificó el número de células multinucleadas TRAP+. Los valores se representan como la media \pm SEM de dos experimentos independientes. B, Fotografías de células CFU-GM desarrolladas en presencia de OPG (100 ng/ml), tratadas con M-CSF (25 ng/ml) más medio, GzmA (3,5 µg/ml) o RANKL (100 ng/ml). Las células se tiñeron con TRAP después de 6 días (X 10 aumentos). C, Células CFU-GM desarrolladas en presencia de OPG (100 ng/ml) se trataron con M-CSF (25 ng/ml) más medio, GzmA (3,5 µg/ml) o RANKL (100 ng/ml). Las células se tiñeron con TRAP después de 6 días y se cuantificó el número y la superficie de las células multinucleadas TRAP positivas. Los valores se presentan como media \pm SEM de más de 300 OCs, cuantificados en 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student no pareado. *** p < 0,001.

4.1.9 Mecanismo de la formación de OCs inducida por GzmA

Para comprender el mecanismo a través del cual la GzmA induce la formación de OCs, se estudió la posibilidad de que la proteasa estimulara la osteoclastogénesis induciendo a los precursores a expresar y secretar TNF- α . Esta posibilidad se fundamentó en hallazgos previos de que la GzmA induce a las células adherentes humanas a producir TNF- α (133), citoquina que desempeña un papel primordial favoreciendo la diferenciación de OCs (612-617). Para estos experimentos, se usaron células CFU-GM y RAW 264.7 como fuentes de precursores. Las células RAW 264.7 representan un modelo documentado para el estudio de la diferenciación de OCs (596). Inicialmente, las células RAW 264.7 se trataron con GzmA (3,5 μ g/ml) y se evaluó, mediante RT-PCR semicuantitativa, la expresión de mRNA para TNF- α . Como se muestra en la figura 4.13A, la GzmA estimuló la expresión de TNF- α , desde las 6 horas de iniciado el tratamiento y de forma sostenida durante 48 horas. El sobrenadante de las células tratadas con GzmA durante 48 horas produjo TNF- α en un intervalo de concentraciones de 0,9 a 1,5 ng/ml por 10^6 células. Luego, se determinó si la adición de un anticuerpo anti-TNF- α a células RAW 264.7 o células CFU-GM, estimuladas con GzmA, influía en la generación y maduración de OCs. Ambos tipos de células se incubaron con GzmA (3,5 μ g/ml) en presencia de cantidades crecientes de anti-TNF- α (0,01–7,5 μ g/ml). La formación de OCs se determinó evaluando la actividad TRAP. Como se puede apreciar, a partir de una concentración de 2 μ g/ml, el anticuerpo anti-TNF- α bloqueó de forma efectiva la maduración de OCs estimulada por GzmA (Figura 4.13B). Para valorar los efectos no específicos del anticuerpo en la osteoclastogénesis, se estimularon, de forma paralela, las células RAW 264.7 y las células CFU-GM con RANKL (control positivo). La presencia de concentraciones crecientes de anti-TNF- α dio como resultado, una vez más, la reducción de la capacidad de la GzmA para estimular la formación de OCs. En comparación, el anticuerpo anti-TNF- α no neutralizó del todo la acción de RANKL sobre la maduración de OCs (Figura 4.13C). Estos datos sugieren que la

GzmA estimula la maduración de OCs a través de la expresión y secreción de TNF- α de células precursoras.

Para profundizar en el papel del TNF- α en la osteoclastogénesis mediada por GzmA, se estudió capacidad de respuesta de las células CFU-GM aisladas de ratones wt y de ratones TNF^{-/-} frente a la proteasa, así como la respuesta de estas células a TNF- α recombinante y RANKL. El ensayo de formación de OCs demostró que la GzmA estimuló a las células CFU-GM aisladas de ratones wt, y esta respuesta fue suprimida por la adición de anticuerpos monoclonales anti-TNF- α . Por otra parte, se pudo comprobar que la GzmA no logró inducir osteoclastogénesis en las células CFU-GM de ratones deficientes en TNF- α (Figura 4.14A). De manera comparable, cuando se añadió TNF- α recombinante a las células CFU-GM provenientes de ratones wt, se observó formación de OCs (Figura 4.14B). También se constató que RANKL estimuló la formación y maduración de OCs en las células CFU-GM wt y células CFU-GM TNF^{-/-}, aunque en estas últimas en menor magnitud en comparación con las células de ratones wt (Figura 4.14C). Estos datos confirman que el TNF- α es un mediador inducido por GzmA, que facilita la maduración de OCs y también respalda el concepto de que el TNF- α es crítico para la efectividad óptima de RANKL.

Cuando se utilizaron como control células CFU-GM wt tratadas con RANKL en presencia de OPG se puso constatar que se bloqueaba por completo la acción osteoclastogénica del RANKL (Figura 4.14C). Estos datos confirman que la producción de TNF- α estimulada por GzmA, es un importante mediador de la formación de OCs.

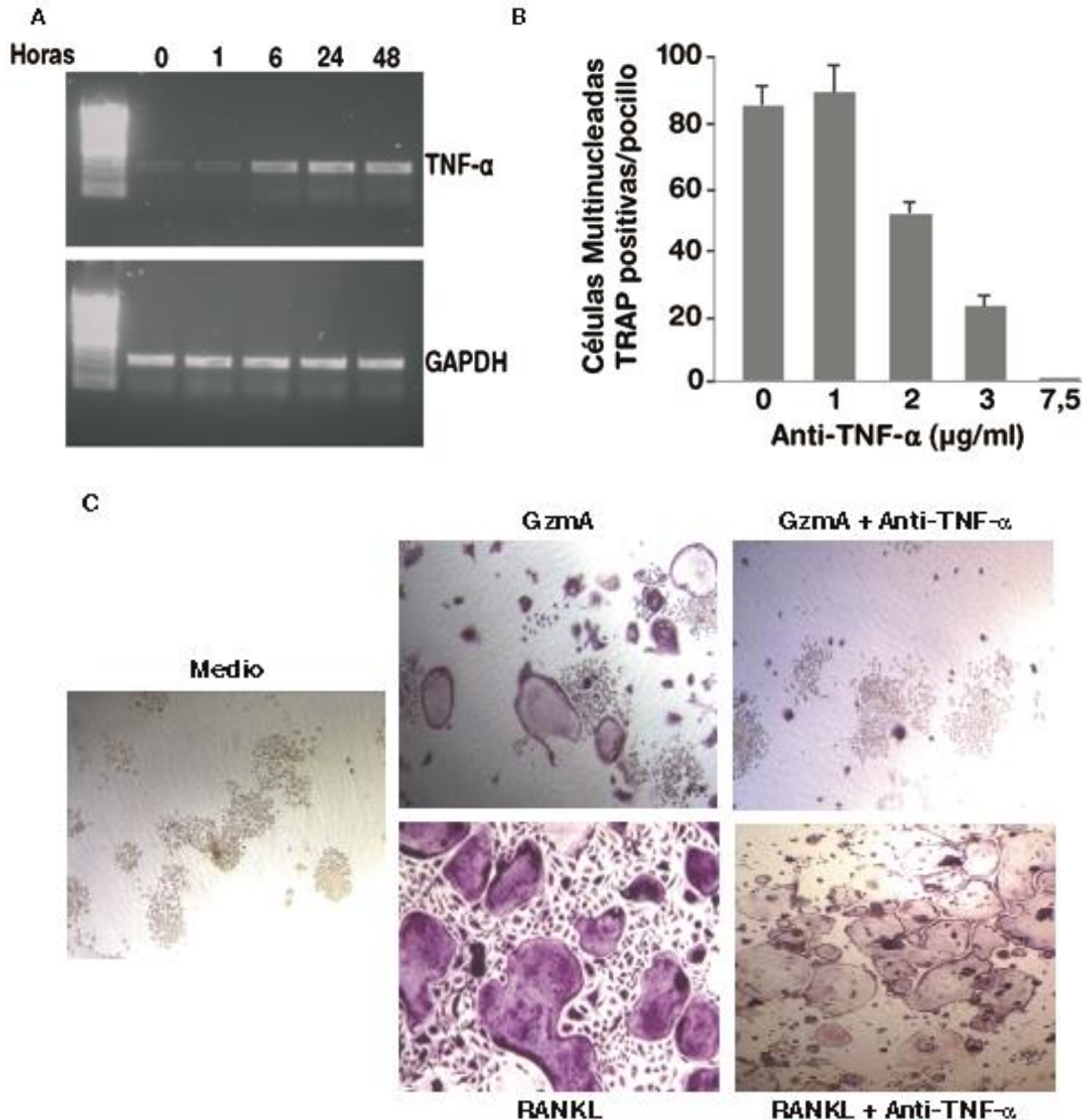


Figura 4.13 Contribución del TNF- α a la osteoclastogénesis inducida por la GzmA. A, Células RAW 264.7 se trataron con GzmA (3,5 $\mu\text{g/ml}$) durante los tiempos indicados y se analizó la expresión de mRNA para TNF- α . Los resultados se expresan en relación al mRNA de GAPDH (control). B, Células RAW 264.7 se incubaron con GzmA (3,5 $\mu\text{g/ml}$) y concentraciones crecientes del anticuerpo neutralizante anti-TNF- α . Los valores se representan como la media \pm SEM del número de células multinucleadas TRAP+ en 3 experimentos independientes. C, Evaluación del efecto del anticuerpo anti-TNF- α sobre la maduración de OCs inducida por RANKL y GzmA. Las células RAW 264.7 se incubaron durante 6 días con RANKL (100 ng/ml) o GzmA (3,5 $\mu\text{g/ml}$) en presencia o ausencia de anticuerpo anti-TNF- α .

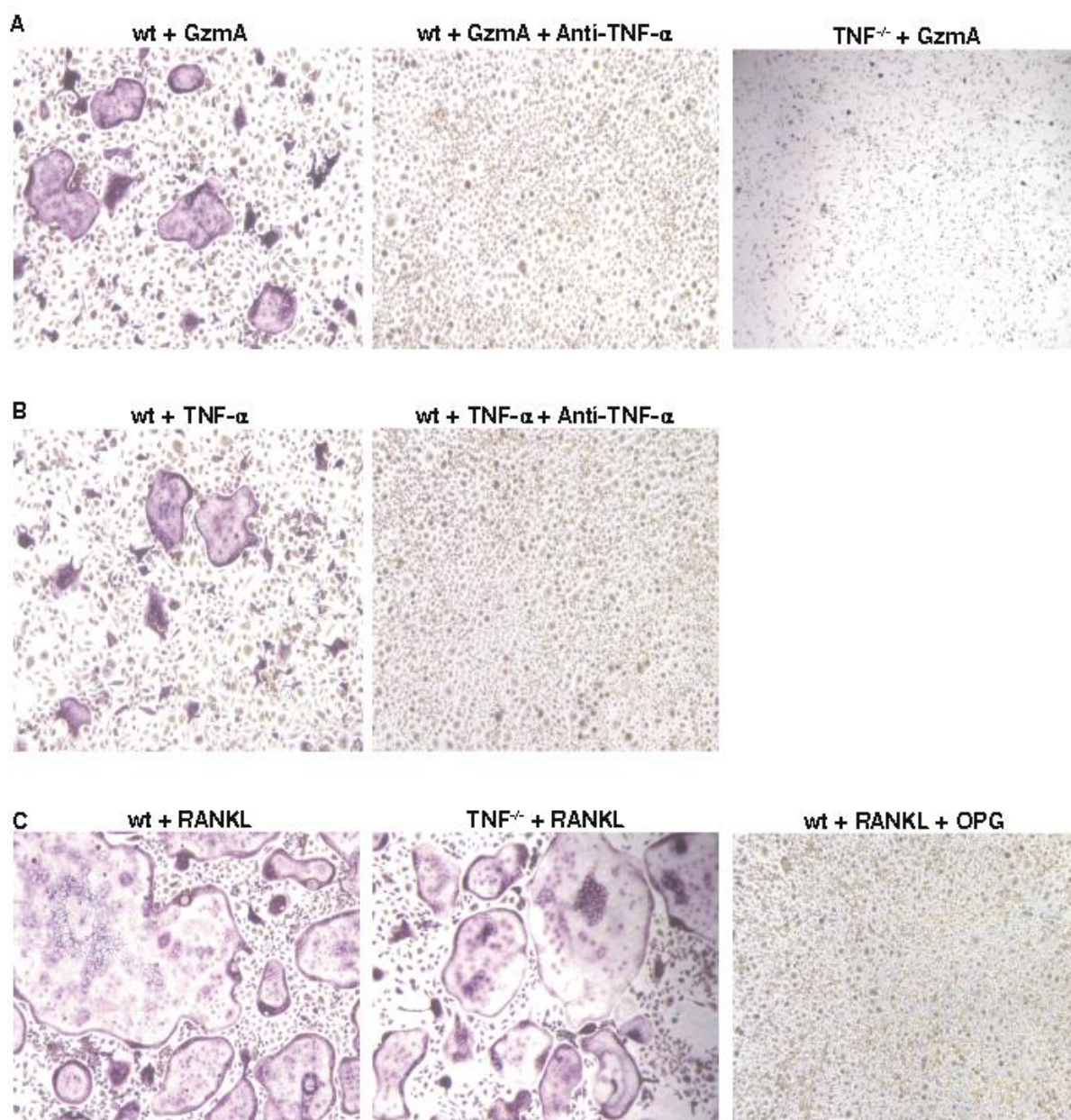


Figura 4.14 Contribución del TNF- α a la formación de OCs inducida por GzmA. A, Células CFU-GM, obtenidas de ratones wt o deficientes de TNF- α , se trataron con M-CSF (25 ng/ml) más GzmA (3,5 μ g/ml). En el caso de las CFU-GM wt, también se incubaron en presencia o ausencia del anticuerpo neutralizador anti-TNF- α . B, Células CFU-GM, obtenidas de ratones wt, se trataron con M-CSF (25 ng/ml) más TNF- α recombinante (50 ng/ml) en presencia o ausencia de anticuerpo neutralizador anti-TNF- α . C, Células CFU-GM, obtenidas de ratones wt o deficientes en TNF- α , se trataron con M-CSF (25 ng/ml) más RANKL (100 ng/ml). Como control se utilizaron células CFU-GM wt tratadas con RANKL en presencia y ausencia de OPG. En todos los casos la formación de OCs se determinó mediante la tinción para TRAP. Ampliación original X 10.

4.1.10 Discusión

Se ha demostrado que los pacientes con AR tienen niveles elevados de GzmA en el plasma y en el líquido sinovial de las articulaciones inflamadas (111, 146). De igual forma se observó, utilizando un modelo murino de artritis inducida por Chikungunya, incremento de la expresión de GzmA en las articulaciones y ganglios linfáticos, demostrando que los ratones deficientes en GzmA presentaban una menor severidad en la artritis inducida por este virus (587).

En este estudio hemos encontrado evidencias de que la artritis inducida por colágeno está disminuida en ratones que carecen de GzmA. En este modelo murino de artritis inflamatoria inducida por CII (CIA), descubrimos que la ausencia de GzmA redujo sustancialmente la inflamación y los cambios patológicos en la membrana sinovial y el hueso contiguo, lo que se correlacionó con cantidades reducidas de OCs en las articulaciones de los ratones GzmA^{-/-} y niveles reducidos de ICTP (fragmentos derivados de la degradación del colágeno tipo I), medida de la degradación ósea y actividad de los OCs.

A pesar de que se ha observado que las NK, los linfocitos T CD4⁺ y varias otras células inmunes estimulan la osteoclastogénesis, favoreciendo la destrucción ósea (618), los mediadores que contribuyen a este resultado patológico siguen sin estar del todo elucidados. Los resultados obtenidos en este estudio sugirieron que la GzmA podría ser el mediador en el modelo CIA. Como ya se comentó en los resultados, las puntuaciones clínicas e histológicas se redujeron sustancialmente en ratones que carecían de GzmA. Es importante recalcar que solo el 40 % de los ratones GzmA^{-/-} inmunizados desarrollaron poliartritis, en comparación con el 80 % y el 60 % de los ratones wt y Perf^{-/-}, respectivamente. Además, la severidad de la poliartritis en animales enfermos también se redujo a menos del 50 % de los ratones que carecen de GzmA. Se requerirán experimentos de depleción y transferencia de células para confirmar que las NK son la fuente de GzmA durante la CIA.

La contribución de GzmA al desarrollo de la patología articular parece ser independiente de la Perf. Nuestras observaciones concuerdan con otros resultados en los que la CIA se redujo en los ratones Perf^{-/-} (619), sin embargo,

en nuestro caso la atenuación de la severidad de la enfermedad en los $\text{Perf}^{-/-}$ fue menor que en los ratones deficientes en GzmA, demostrando esto que acción extracelular de la GzmA. Este hallazgo confirma la relevancia fisiológica de estudios previos en los que se detectó GzmA extracelular tanto en suero como en líquido sinovial de humanos con AR (111, 605). Análogamente a los estudios en humanos, aquí encontramos que la GzmA extracelular aumentó significativamente en el suero y las articulaciones de los ratones sometidos a CIA. Todos estos resultados nos permiten asegurar que la GzmA secretada por las células citotóxicas contribuye al desarrollo de la CIA. La inducción de osteoclastogénesis mediada por la GzmA parece ser el mecanismo a través de cual la proteasa ejerce su acción *in vivo* (618).

Los OCs son células multinucleadas derivadas de células del linaje monocitos/macrófagos, siendo las células CFU-GM una de las primeras precursoras de estos (608). Los factores de reabsorción ósea regulan la diferenciación de OCs de manera directa o a través de la acción sobre las células accesorias, las cuales proporcionan factores osteoclastogénicos, como M-CSF y RANKL. En este trabajo constatamos que cuando una población mixta que contenía precursores de OCs y células accesorias (células de médula ósea no adherentes) se estimulaban con GzmA y cantidades suficientes OPG (para inhibir el RANKL), ocurría la diferenciación a OCs. Especial relevancia reviste el hecho de que la GzmA estimuló a las células precursoras de OCs, altamente enriquecidas de la médula ósea (CFU-GM) en presencia de OPG, así como una línea celular precursora de OCs (RAW 264.7), para convertirse en OCs maduros. Por lo tanto, la GzmA parece actuar directamente sobre las células precursoras sin la participación de la vía RANK/RANKL, como se demostró al utilizar la proteína soluble OPG, receptor señuelo del RANKL. No obstante, para excluir definitivamente la participación de RANKL en la osteoclastogénesis inducida por GzmA, se necesitarían células precursoras de ratones RANK/RANKL-knock out. Por lo tanto, estos datos no excluyen la posibilidad de que pequeñas cantidades de RANKL, que no fueron inhibidas por OPG, contribuyeran a la diferenciación y activación de OCs inducida por GzmA y así poder explicar la resistencia de los ratones $\text{RANK}^{-/-}$ a la estimulación con citoquinas proinflamatorias (620).

Se ha demostrado que cantidades muy pequeñas de RANKL pueden hacer sinergia con TNF- α para inducir la diferenciación de OCs (614). Según nuestros resultados, la GzmA parece influir en la proliferación, diferenciación y expresión génica de OCs, en parte, a través del TNF- α . Los datos mostraron que la expresión de mRNA de TNF- α fue estimulada por GzmA en las células precursoras de OCs RAW 264.7 y, al usar un anticuerpo contra TNF- α se bloqueó la acción osteoclastogénica de la GzmA. Sin embargo, los precursores provenientes de médula ósea de ratones TNF^{-/-} no respondieron a la GzmA. Se ha reportado que los precursores de OCs expresan IL-1, IL-6 y TNF- α (621, 622). El TNF- α posiblemente contribuye a la diferenciación de OCs a través de la activación del receptor p55 (623-625). Sin embargo, existe controversia con respecto a la capacidad del TNF- α para inducir osteoclastogénesis en ausencia de RANKL. Zou et al informaron originalmente que el TNF- α podría inducir directamente la osteoclastogénesis, pero que la magnitud de la respuesta era sustancialmente menor en comparación con la inducida por RANKL (626). Otros investigadores han sugerido que TNF- α no puede inducir osteoclastogénesis a menos que las células estén presensibilizadas con RANKL (614). Kitaura et al establecieron que se requiere TNF- α para la estimulación de los precursores de OCs *in vivo* y la citoquina sensibiliza, *in vitro*, a los precursores para responder a RANKL (627), haciendo énfasis en la interrelación crítica entre RANKL y TNF- α durante la pérdida ósea (628, 629). Esta interacción también es válida para el efecto de RANKL, ya que su capacidad osteoclastogénica se reduce en ausencia de TNF- α , como se mostró en el presente estudio, resultado que concuerda con lo observado también por otros investigadores (627-629). Finalmente, Kim et al proporcionaron la evidencia más definitiva de que el TNF- α es capaz de inducir osteoclastogénesis *in vitro*, independientemente de RANKL, aunque debe tenerse en cuenta que en este caso, el efecto requirió otras citoquinas, como TGF- β (279).

En general, nuestros resultados sugieren que la GzmA induce a los precursores de OCs para expresar y secretar TNF- α , lo que luego contribuye a la maduración de OCs. Sin embargo, como se discutió anteriormente, no podemos

excluir completamente la posibilidad de que otras citoquinas, como el TGF- β o RANKL, junto con TNF- α , también contribuyan a la diferenciación de OCs mediada por GzmA.

Los resultados histopatológicos obtenidos sugieren que la GzmA está estrechamente asociada con el daño del cartílago y el daño óseo en las patas y rodillas de los ratones con CIA, y en menor medida con los signos de inflamación e hiperplasia sinovial en las articulaciones afectadas (Figura 4.2A-B). Por otro lado se constató que, en ausencia de Perf no se redujo significativamente la destrucción del cartílago y del hueso, lo que respalda los datos obtenidos *in vitro*, que muestran que la GzmA indujo la diferenciación de OCs en ausencia de Perf. La prueba definitiva sobre la contribución de la GzmA a la osteoclastogénesis en la artritis *in vivo*, se encontró durante el estudio de la expresión y actividad de OCs en ratones wt y GzmA^{-/-}. Así, en ausencia de GzmA se detectó reducción significativa en la expresión de OCs en las articulaciones artríticas, un hallazgo que se correlacionó con niveles disminuidos de ICTP, un indicador relevante de degradación ósea.

La inflamación reducida en las patas y las rodillas de los ratones GzmA^{-/-} también fue evidente, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística. El resultado indicó, una vez más, que la GzmA contribuye a la inflamación *in vivo*, hecho demostrado anteriormente en condiciones como sepsis (133, 150). Se sabe que los niveles de IFN- γ , IL-6, IL-17 y TNF- α aumentan en el suero de pacientes con AR (630). En concordancia, en este estudio también encontramos que los niveles de IFN- γ , IL-6, IL-17 y TNF- α aumentaron en ratones con CIA, tanto en las etapas tempranas como tardías de la enfermedad. En todos los casos, los niveles de estas citoquinas se redujeron en ausencia de GzmA. En particular, no se detectó IL-6 en el suero de ratones GzmA^{-/-} inmunizados. Además, los ganglios linfáticos de ratones artríticos GzmA^{-/-} produjeron cantidades significativamente menores de TNF- α e IL-17A en respuesta al colágeno, lo que refuerza la participación de GzmA en la producción de estas citoquinas por las células inmunes. Estos datos confirman que la ausencia de GzmA también reduce la producción de citoquinas proinflamatorias *in vivo*. Cuando se combina con datos de histopatología, se respalda el concepto de que

la ausencia de GzmA atenúa los signos de daño articular en este modelo de ratón.

Nuestros datos *in vitro* reafirmaron lo observado *in vivo*, mostrando claramente que la GzmA actúa como un factor pro-osteoclastogénico, efecto este que es dependiente de la secreción autocrina de TNF- α por las células precursoras. La proteasa demostró que puede actuar sobre células GFU-CM, o sobre la línea celular RAW 264.7, para producir TNF- α , lo que a su vez estimuló la osteoclastogénesis.

En resumen, podemos afirmar que la GzmA contribuye a la AR inflamatoria *in vivo* independientemente de Perf, por un mecanismo que podría estar relacionado con la capacidad de la GzmA para estimular la formación de OCs mediada por TNF- α . Especulamos que la GzmA es secretada en la membrana sinovial de la articulación reumatoide durante la respuesta inmune innata y adaptativa. Allí, la GzmA activa a los monocitos y otros precursores de OCs para secretar TNF- α , aumentando así la destrucción ósea proinflamatoria observada en la AR. Sin embargo, el mecanismo involucrado es complejo, pudiendo actuar directamente, promoviendo la diferenciación de OCs, o indirectamente, favoreciendo la respuesta inflamatoria.

Independientemente del mecanismo utilizado por la GzmA para promover la AR *in vivo*, y a la luz de los hallazgos anteriores que indican que la ausencia de GzmA no afecta significativamente el desarrollo tumoral o el control de la infección con la mayoría de los patógenos (13, 30, 75), nuestros datos sugieren claramente que el desarrollo de inhibidores de GzmA podrían tener un efecto beneficioso si se usan para el tratamiento de la AR, actuando una manera más selectiva que otros medicamentos antiinflamatorios que se usan comúnmente, como los corticosteroides o los bloqueadores del TNF- α . De hecho, en un modelo murino de artritis inducida por el virus Chikungunya se observó que la inhibición farmacológica de la GzmA, utilizando el serpinb6b, redujo significativamente la inflamación de las articulaciones de ratones wt, sin afectar la viremia (587).

Todos estos resultados reafirman la opinión de que la GzmA tiene un papel proinflamatorio extracelular y que la inhibición de la proteasa representa una diana potencial para posibles fármacos antirreumatoides.

4.2 Colitis y CAC. Papel de la GzmA en el modelo DSS y DSS/AOM.

4.2.1 GzmA activa incrementada en el tejido de colon de animales tratados con DSS y DSS/AOM

Se ha descrito incremento de la expresión del mRNA de PERF y GZMA, así como de las células citotóxicas activadas, en la lámina propia y en las células epiteliales de pacientes con EII activa (154). Basándonos en estos resultados previos, en este trabajo se investigó si la expresión de mRNA de GZMA aumentaba en ratones wt durante la colitis crónica inducida por DSS y durante el CAC, inducido por DSS/AOM. Como se muestra en la figura 4.15A, la expresión de mRNA de GZMA se elevó significativamente en ratones tratados con DSS y DSS/AOM, lo que se correlacionó con un nivel de proteína significativamente mayor en cultivos de explantes de tejido de colon (distal y proximal) de ratones wt tratados con DSS y DSS/AOM, en comparación con los animales no tratados (Figura 4.15B). Finalmente, se confirmó mediante un ensayo colorimétrico que la GzmA presente en los sobrenadantes se encontraba activa, siendo esta actividad mayor en muestras de animales tratados que en los ratones wt control no tratados (Figura 4.15C).

Una vez que se identificó que se secretaba GzmA activa al sobrenadantes del cultivo de explantes *ex vivo*, se analizó la expresión intracelular de la proteasa en el tejido intestinal de animales tratados con DSS/AOM. En la figura 4.15D se muestra un resumen de la estrategia utilizada para identificar diferentes poblaciones de células inmunes intraepiteliales (IELs). Nos centramos en las células NK, NKT y linfocitos T como las principales fuentes potenciales de GzmA, en función del perfil celular, que previamente se ha notificado, para la expresión de GzmA (82). Como se muestra en la figura 4.15E los IELs, aislados de ratones wt tratados con DSS/AOM, NK/ILC1 (CD45+/NK1.1+/CD3-), las células NKT (CD45+/NK1.1+/CD3+) y las células T CD8 (CD45+/CD8a+/CD3+), incrementaron significativamente la expresión de GzmA. La proporción de células CD8α+/CD3- que expresan GzmA no aumentó durante el tratamiento con DSS/AOM. Esta población podría representar a las IELs residentes CD8αα+/TCR-/CD3- (631). Por el contrario, los linfocitos T CD4+

(CD45+/CD4+/CD3+) no expresaron GzmA, pero sí aumentaron significativamente en los animales tratados con DSS/AOM (Figura 4.15E). No se detectó expresión de GzmA en ninguno de los subtipos celulares extraídos del tejido de colon de animales GzmA^{-/-}, confirmando la detección específica de GzmA en las poblaciones de células indicadas.

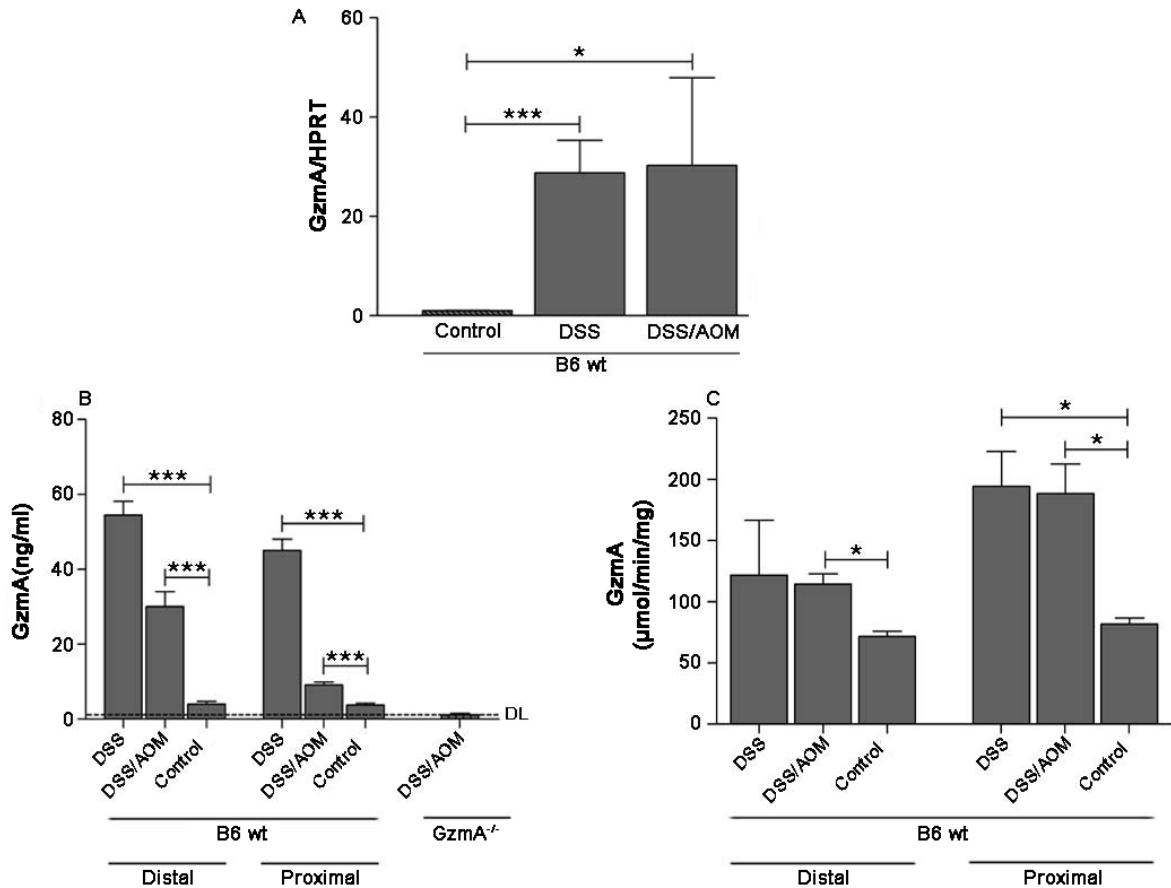


Figura 4.15A-C Aumento de la expresión de mRNA de GZMA y altos niveles de GzmA activa en el cultivo de explantes de ratones wt. Ratones macho wt fueron tratados con DSS y DSS/AOM como se describe en los materiales y métodos. Los ratones fueron sacrificados el día 56 de iniciado el tratamiento. A, Se determinaron los niveles de expresión de mRNA de GZMA mediante RT-qPCR. La expresión de mRNA se normalizó con respecto a la cantidad de mRNA de HPRT (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa). Los datos se presentan como media \pm SEM de 3 réplicas biológicas realizadas en 2 experimentos independientes. B, Se cultivaron muestras de tejido colónico (30 mg) durante 24 h, se recogió el sobrenadante y se cuantificaron los niveles de GzmA mediante ELISA, en colon proximal y distal. C, Se realizó un ensayo colorimétrico, en el sobrenadante del cultivo ex vivo de tejido de colon, para determinar la actividad de GzmA. La actividad enzimática específica de GzmA se calculó restando la actividad residual inespecífica similar a triptasa detectada en animales GzmA^{-/-}, utilizados como control de la actividad observada en ratones wt. (DO). Los datos se presentan como media \pm SEM de 5 réplicas biológicas realizadas en 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Resultados y Discusión

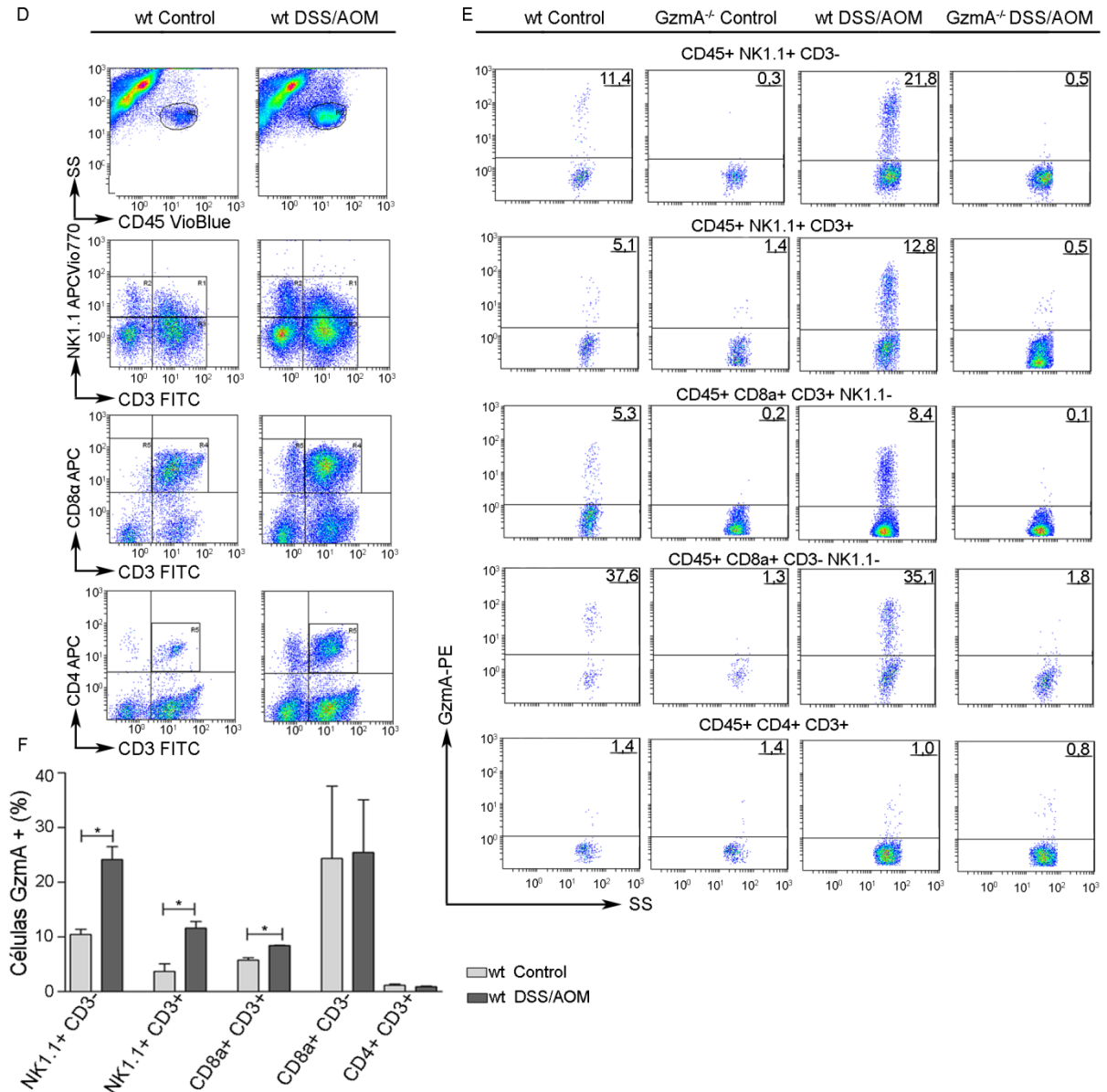


Figura 4.15D-F. Expresión de GzmA por IELs. Ratones machos wt y deficientes en GzmA fueron tratados con DSS/AOM como se describe en la sección de materiales y métodos. D, Se aislaron las IELs a partir del tejido de colon el día 49 de tratamiento con DSS/AOM. Las IELs se tiñeron con una combinación de anti-CD3 conjugado con FITC, anti-CD8α conjugado con APC, anti-NK1.1 conjugado con APC-Vio770 y anti-CD45 conjugado con VioBlue. La expresión intracelular de GzmA se analizó usando un anticuerpo anti-GzmA conjugado con PE. E, En los Dot plots se muestra un experimento representativo. Los números representan el porcentaje de células positivas para GzmA para cada fenotipo de IELs. Como control se aislaron IELs de ratones wt y GzmA^{-/-} no tratados. F, Gráfico de barras que representa la media ± SEM de células positivas para GzmA en cada subtipo de IEL (2 experimentos independientes). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student, comparando los ratones wt tratados con los ratones wt sin tratar. * p < 0,05.

4.2.2 Evaluación de la colitis ulcerativa crónica *in vivo*

Para investigar el papel de GzmA *in vivo* durante la colitis crónica, ratones wt y ratones GzmA^{-/-} se trataron con DSS al 2,5 % durante tres ciclos. Los ratones fueron pesados y examinados diariamente. Se realizaron observaciones clínicas, estableciéndose una puntuación para la gravedad de la colitis.

Uno de los principales indicadores del inicio y la severidad de la colitis es la pérdida de peso corporal. En el presente trabajo se observó una pronunciada reducción del peso corporal en ratones wt, especialmente durante la primera semana después del primer ciclo de DSS, que corresponde con la fase aguda de la colitis. En contraste, la pérdida de peso se atenuó significativamente en ratones GzmA^{-/-} (Figura 4.16A). La gravedad de la colitis en ratones deficientes en GzmA se redujo significativamente en comparación con los ratones wt, según lo observado a través de la monitorización de la puntuación clínica (Figura 4.16B).

La pérdida de peso atenuada y la mejora de la enfermedad clínica dieron como resultado una alta supervivencia de los ratones GzmA^{-/-} en comparación con los ratones wt. La figura 4.16C muestra que solo alrededor del 50 % de los ratones wt tratados con DSS sobrevivieron durante los primeros diez días. En contraste, aproximadamente el 85 % de los ratones deficientes en GzmA tratados con DSS sobrevivieron. Todos estos resultados indican que GzmA contribuye al desarrollo de la colitis en este modelo animal.

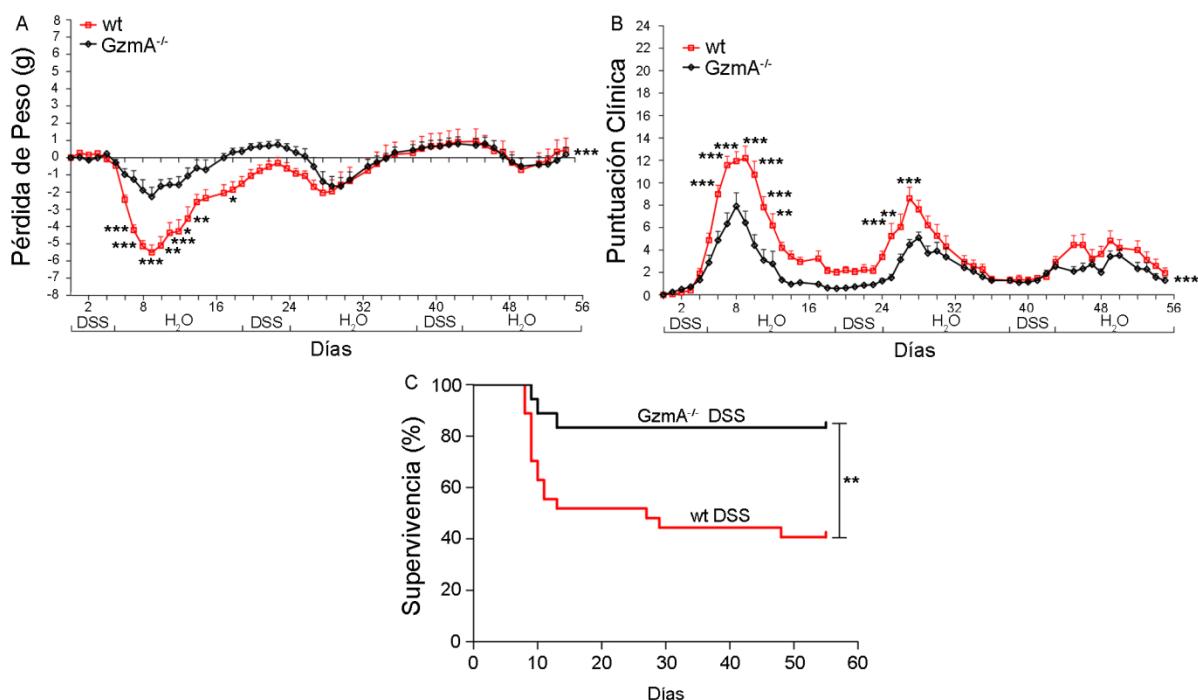


Figura 4.16 Disminución de la colitis crónica inducida por DSS en ratones deficientes en GzmA *in vivo*. Ratones machos wt y GzmA^{-/-} se trataron con DSS, como se describe en los materiales y métodos. A, Cambios en el peso. B, Puntuación clínica. La evaluación se realizó cada 1-2 días. Los datos se presentan como la media \pm SEM de 33 (wt) y 26 (GzmA^{-/-}) réplicas biológicas (ratones individuales) realizadas en 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de dos vías, con la prueba posterior de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. C, Se evaluó la supervivencia. Las curvas de supervivencia corresponden a de 33 (wt) y 26 (GzmA^{-/-}) réplicas biológicas (ratones individuales) realizadas en 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de log-rank. ** $p < 0,01$.

4.2.3 Evaluación del daño macroscópico y microscópico en UC crónica *in vivo*

La longitud del colon disminuye a medida que se desarrolla la colitis, siendo una medida cuantitativa de la gravedad de la enfermedad (154). En este estudio se encontró un acortamiento significativo en la longitud del colon en ratones wt en comparación con ratones deficientes en GzmA, en la misma etapa de la enfermedad (Figura 4.17A). El peso húmedo del colon también aumentó significativamente en los ratones wt en comparación con los ratones deficientes en GzmA (Figura 4.17A). En el modelo de colitis crónica inducida por DSS, la inflamación se asocia con un aumento del peso del colon debido a la naturaleza granulomatosa de la inflamación (632). En la necropsia, se analizó el daño visible en el colon para establecer una puntuación macroscópica, basada en el edema, la diarrea, el sangrado y otros parámetros. Macroscópicamente, la

inflamación se localizó generalmente en el colon distal en ambas cepas y se constató que la puntuación inflamatoria fue significativamente menor en ratones deficientes en GzmA que en ratones wt (Figura 4.17B). Otras características encontradas al final del estudio en los ratones sometidos a tratamiento fueron: disminución en el tamaño y la pérdida de la estructura anatómica del ciego y el aumento de los ganglios linfáticos mesentéricos, aunque estos parámetros no fueron evaluados en este estudio.

El examen histológico fue compatible con la puntuación del daño macroscópico y la gravedad de la enfermedad (puntuación clínica). La tinción con H&E de las secciones de tejidos de colon de ratones wt, mostró infiltración de leucocitos en la lámina propia, hiperplasia epitelial y presencia de marcadores de inflamación severa, como abscesos de cripta, inflamación de la submucosa y úlceras. Por el contrario, los ratones GzmA^{-/-} mostraron menos signos de inflamación y grado de lesión de la mucosa. El infiltrado inflamatorio en el colon de ratones GzmA^{-/-} solo afectó las capas superficiales de la mucosa, mientras que las criptas estaban más preservadas. Para cuantificar el daño tisular se estableció una puntuación basada en la inflamación, el daño en las criptas y la extensión de las lesiones. Cada parámetro individual, así como la puntuación total histológica, fue significativamente más baja en ratones GzmA^{-/-} que en ratones wt (Figura 4.17C).

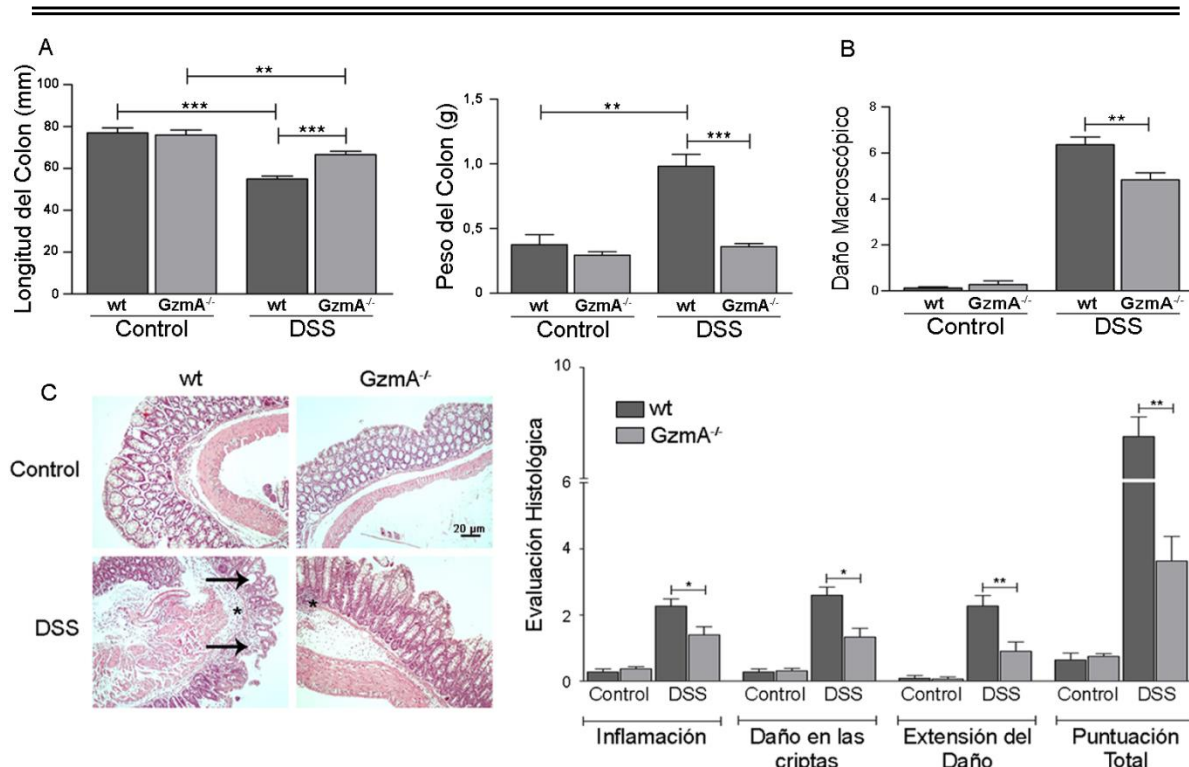


Figura 4.17 Disminución del daño macroscópico y microscópico durante la colitis inducida por DSS en ratones deficientes en GzmA *in vivo*. Ratones machos wt y GzmA^{-/-} se trataron con DSS, como se describe en los materiales y métodos. Al final del estudio, los animales se sacrificaron y se extrajo el colon. A, Medición y determinación del peso húmedo del colon. B, Evaluación macroscópica del daño visible a nivel de colon. Los datos se presentan como media \pm SEM de 33 (wt) y 26 (GzmA^{-/-}) réplicas biológicas (ratones individuales) en 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. C, Estudio histopatológico. En el panel de la izquierda se muestran imágenes representativas de la tinción con H&E (escala equivale a 20 μ m). Los asteriscos indican inflamación y las flechas muestran vasos linfáticos hipertróficos en ratones tratados con DSS. Se estableció una puntuación histológica como se indica en la sección de materiales y métodos. El gráfico de la derecha representa la puntuación de cada parámetro individual y la puntuación total. Los datos se presentan como media \pm SEM de 5 wt y 5 GzmA^{-/-}. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.4 Cuantificación de citoquinas inflamatorias en explantes de cultivo de tejido de colon de ratones wt y GzmA^{-/-} durante colitis crónica

A continuación, se midió el nivel de varias citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-17) y de la citoquina antiinflamatoria IL-10 durante colitis crónica inducida por el DSS, en las porciones distal y proximal del colon.

Durante la colitis crónica, en general, los niveles de citoquinas proinflamatorias aumentaron, especialmente en ratones wt tratados con DSS, en comparación con sus respectivos ratones control no tratados. En el colon distal

todas las citoquinas proinflamatorias se redujeron significativamente en ratones $GzmA^{-/-}$ en comparación con los ratones wt (Figura 4.18), con excepción de la IL-1 β . En el colon proximal, los niveles de TNF- α , IFN- γ e IL-6 aumentaron, siendo significativamente más altos en ratones wt que en ratones knock-out para GzmA. A nivel proximal, la IL-1 β e IL-17 también se elevaron en los ratones wt en comparación con los ratones deficientes en GzmA, aunque no hubo diferencias significativas entre las cepas (Figura 4.18). En contraste con las citoquinas proinflamatorias, el nivel de IL-10 disminuyó significativamente en ratones wt en comparación con ratones $GzmA^{-/-}$, tanto en el colon proximal como en el distal, lo que confirma que la respuesta inflamatoria se atenuó en ausencia de GzmA durante la colitis crónica.

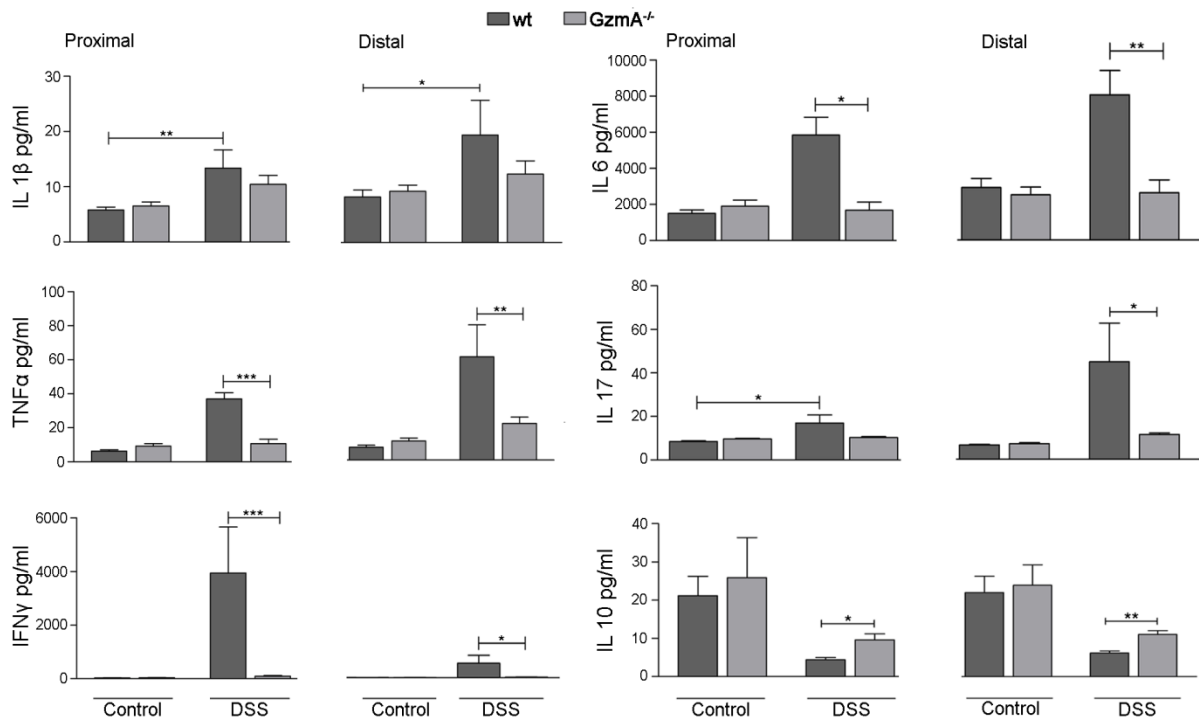


Figura 4.18 Producción de citoquinas en explantes de tejido de colon de ratones wt y $GzmA^{-/-}$ en colitis crónica. Ratones macho wt y ratones deficientes en GzmA se trataron con DSS para inducir colitis crónica, como se describe en la sección de materiales y métodos. Los ratones se sacrificaron el día 56 del tratamiento y las muestras de tejido de colon (30 mg) se cultivaron durante 24 h, se recogió el sobrenadante y se cuantificaron mediante ELISA los niveles de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17 e IL-10, en colon proximal y distal. Los datos se presentan como la media \pm SEM de al menos 10 réplicas biológicas realizadas en 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con el post-test de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Es importante recalcar que el nivel de citoquinas pro-inflamatorias en animales controles no tratados es similar en ambas cepas, lo que indica que las diferencias observadas entre estas, en cuanto a la atenuación de la inflamación y la severidad de la enfermedad, a nivel clínico e histológico, no se deben a diferencias basales en la integridad del colon. Para confirmar aún más este postulado, se llevó a cabo un experimento en el que se evaluó la permeabilidad intestinal basal *in vivo* de ambas cepas. Se administró por vía oral FITC-Dextrano a ratones sanos, wt y deficientes en $GzmA^{-/-}$, y luego de 4 horas se cuantificó en suero la cantidad de esta sustancia que había sido absorbida. Como se observa en la figura 4.19 no hubo diferencias entre los ratones wt y $GzmA^{-/-}$, demostrándose así, una vez más, que en estado basal ambas cepas son comparables y que las diferencias encontradas se deben al papel de la $GzmA$ en el control de la inflamación.

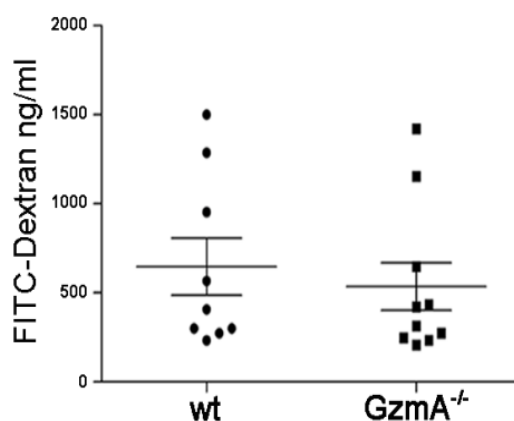


Figura 4.19 Análisis de la permeabilidad intestinal *in vivo* en ratones wt y $GzmA^{-/-}$ controles sanos. Ratones sanos wt y $GzmA^{-/-}$ se trataron con FITC-Dextrano disuelto en PBS (100 mg/ml). Cada ratón recibió 44 mg/100 g de peso corporal mediante sonda oral. Después de 4 h se sacrificaron los ratones y se recogió la sangre. Posteriormente, se separó el suero y se almacenó a 4 °C en la oscuridad. Se añadieron 100 μ l de suero diluido (1:1 en PBS) en una placa de 96 pocillos planos por duplicado. La concentración de FITC en suero se cuantificó por fluorimetría espectrofotográfica a una excitación de 485 nm (ancho de banda de 20 nm) y una longitud de onda de emisión de 528 nm (ancho de banda de 20 nm). Como estándar se utilizó diluciones seriadas de FITC-dextrano.

4.2.5 Evaluación del papel de la $GzmA$ durante la colitis aguda *in vivo*: Puntuación clínica, pérdida de peso y evaluación del daño macroscópico

Una vez comprobada la importancia de la $GzmA$ durante la colitis crónica inducida por DSS, se quiso analizar el papel de esta proteasa durante la colitis

aguda. En esta ocasión se administró solo un ciclo de DSS durante 5 días y los ratones fueron sacrificados al día 10 después de haber iniciado el tratamiento. Se evaluó la severidad de la enfermedad y durante la necropsia el daño macroscópico. También se cuantificaron las citoquinas en explantes de cultivo de tejido de colon.

Para descartar la posible influencia de los antecedentes genéticos y medio ambientales, y además asegurar que los experimentos de colitis inducida por DSS fueron comparables, se usaron ratones hermanos de la misma camada (633), objetivo que se consiguió cruzando ratones C57BL/6 wt con ratones deficientes en *GzmA*, posteriormente las crías heterocigotas para *GzmA* se cruzaron entre ellas. Luego de realizar el genotipado a las crías de este cruce, se escogieron para participar en el estudio los ratones machos con genotipo homocigoto positivo y negativo para *GzmA*.

Como se observa en la figura 4.20A, hubo una marcada reducción del peso corporal en los ratones wt para *GzmA* en comparación con la pérdida de peso que sufrieron los ratones deficientes en *GzmA*. Por otro lado, la monitorización de la severidad de la enfermedad, a través de la puntuación clínica, mostró que la gravedad de la colitis en ratones deficientes en *GzmA* se redujo significativamente en comparación con los ratones que expresaban la proteasa (Figura 4.20B). Las diferencias entre ambas cepas, en cuanto a la pérdida de peso y a la severidad de la enfermedad, fueron mayores a partir del día 5 de iniciado el experimento, es decir, luego de finalizar el ciclo de tratamiento con DSS 2,5 %.

Durante la necropsia, se analizó el daño visible en el colon y se estableció una puntuación macroscópica, basada en el edema, la consistencia y la presencia de sangre en las heces, entre otros parámetros. Los hallazgos observados a nivel macroscópico mostraron, al igual que en la colitis crónica, que en los ratones deficientes en *GzmA*, la colitis aguda inducida por DSS era menos severa en comparación con los ratones wt para *GzmA*. El estudio del daño a nivel macroscópico durante la colitis aguda inducida por el DSS también reveló que hubo un acortamiento significativo en la longitud del colon en ratones wt en comparación con ratones deficientes en *GzmA* (Figura 4.20C).

Resultados y Discusión

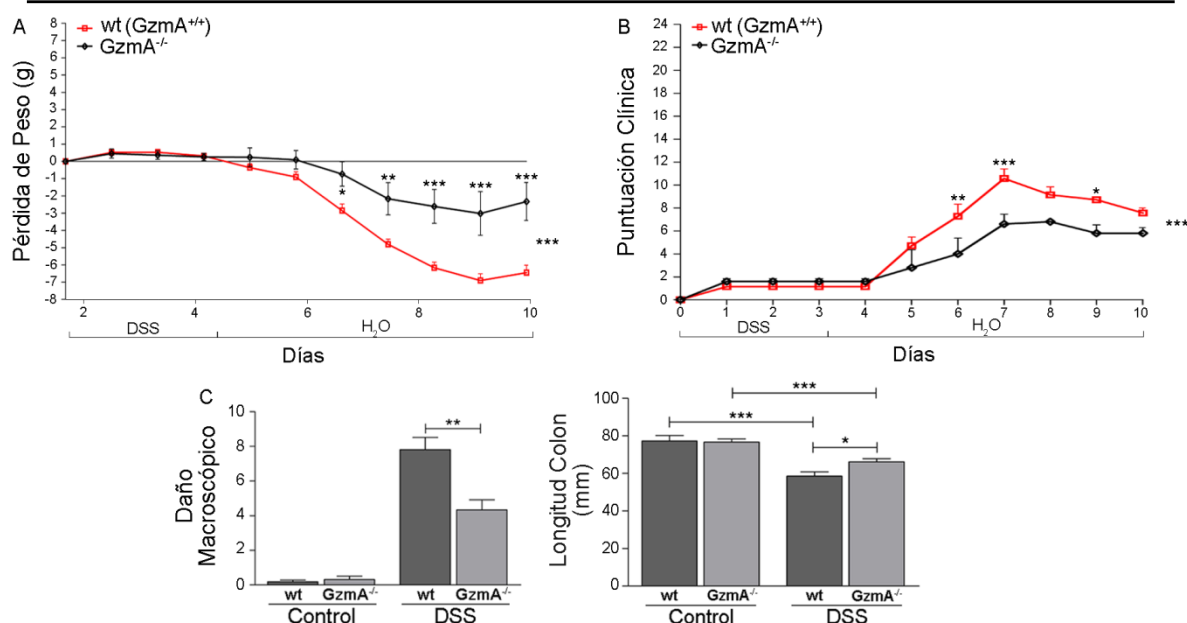


Figura 4.20 Disminución de la severidad de la colitis aguda y del daño macroscópico *in vivo* en ratones deficientes en GzmA tratados con DSS. Ratones macho wt (GzmA^{+/+}) y GzmA^{-/-} se trataron con DSS, como se describe en los materiales y métodos. A, Evaluación de la pérdida de peso en gramos. B, Se evaluó la gravedad de la enfermedad (puntuación clínica). Los datos se presentan como la media \pm SEM de 9 (wt) y 8 (GzmA^{-/-}) réplicas biológicas realizadas en 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de dos vías, con la prueba posterior de Bonferroni. *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Al final del estudio los animales se sacrificaron y se extrajo el colon. C, Evaluación macroscópica del daño visible y determinación de la longitud del colon. Los datos se presentan como media \pm SEM de 9 (wt) y 8 (GzmA^{-/-}) réplicas biológicas en 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

4.2.6 Cuantificación de citoquinas en explantes de cultivo de tejido de colon de ratones wt y GzmA^{-/-} durante colitis aguda

Para evaluar la inflamación a nivel intestinal durante la colitis aguda, se cuantificó el nivel de varias citoquinas proinflamatorias y de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Figura 4.21). Se constató que todas las citoquinas analizadas aumentaron significativamente en los animales wt en comparación con ratones GzmA^{-/-}, tanto en el colon proximal como en el distal, a excepción de IL-6. En general, los niveles de citoquinas fueron más altos en el colon distal en comparación con el colon proximal. Con respecto a la IL-6, se observaron niveles aumentados en los animales tratados con DSS en comparación con sus respectivos controles no tratados, pero sin diferencias entre las cepas estudiadas.

La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria con un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (473, 474). Como se esperaba, los niveles de IL-10 estaban reducidos en animales tratados con DSS en comparación con los animales sanos no tratados. Las cantidades de IL-10 se redujeron significativamente en el colon proximal de ratones wt tratados con DSS en comparación con sus controles sanos. Por otra parte, aunque no hubo diferencias significativas entre los ratones wt y los deficientes en GzmA, los niveles de IL-10 fueron ligeramente más altos en GzmA^{-/-} que en ratones wt durante la colitis aguda inducida por DSS.

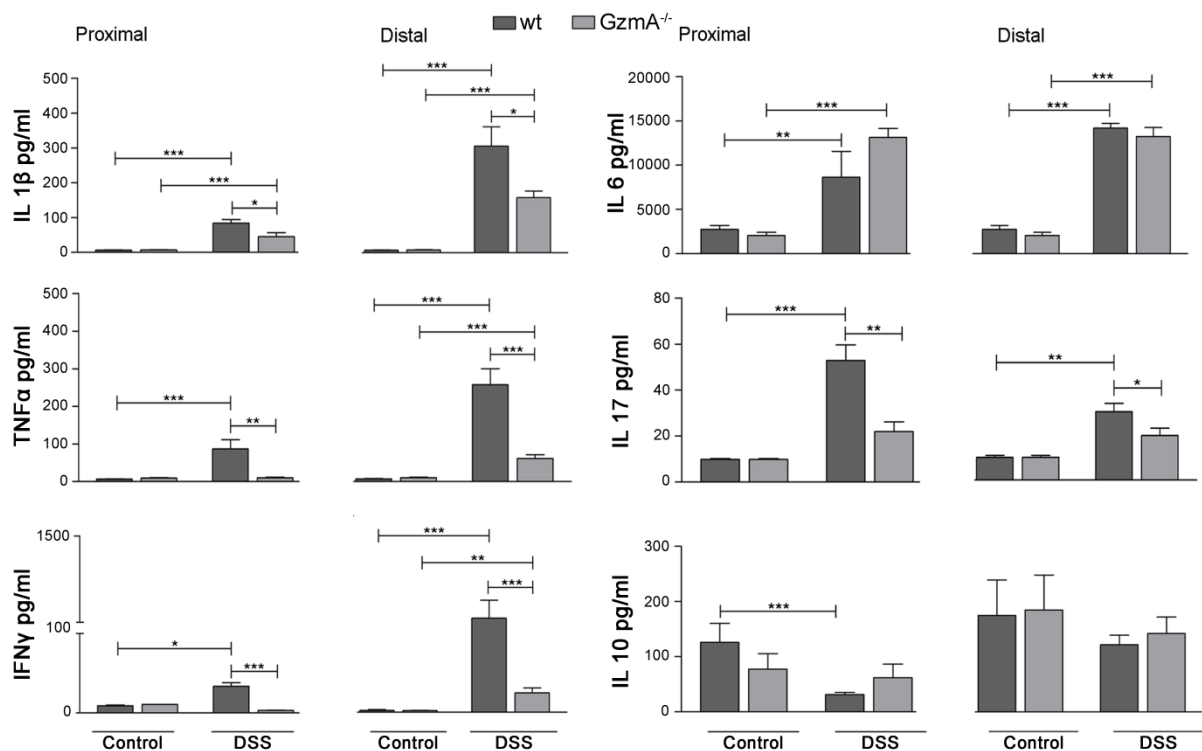


Figura 4.21 Producción de citoquinas en explantes de tejido de colon de ratones wt y GzmA^{-/-} durante la colitis aguda. Ratones macho wt y deficientes en GzmA se trataron con DSS para inducir colitis aguda, como se describe en la sección de materiales y métodos. Los ratones se sacrificaron el día 10 del tratamiento y las muestras de tejido de colon (30 mg) se cultivaron durante 24 h, se recogió el sobrenadante y se cuantificaron mediante ELISA los niveles de IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-17 e IL-10, en colon proximal y distal. Los datos se presentan como la media ± SEM de 9 (wt) y 8 (GzmA^{-/-}) réplicas biológicas realizadas en 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con el post-test de Bonferroni. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

4.2.7 Cáncer asociado a colitis en un modelo *in vivo*. Evaluación de la severidad de la enfermedad y del daño a nivel macroscópico

Una vez que se comprobó que la carencia de GzmA atenuaba la gravedad de la enfermedad y la respuesta inflamatoria, durante la colitis aguda y crónica inducida por DSS, se decidió estudiar si la falta de GzmA afectaría el desarrollo del CCR asociado a la colitis. Para cumplimentar este objetivo utilizamos el protocolo DSS/AOM en ratones wt y GzmA^{-/-}, un modelo ampliamente aceptado y bien caracterizado para inducir CCR de origen inflamatorio (634, 635).

Como se muestra en la figura 4.22A, la pérdida de peso corporal y la puntuación clínica se atenuaron significativamente en ratones GzmA^{-/-} durante el tratamiento con DSS/AOM. Cabe señalar que, la puntuación clínica total (gravedad de la enfermedad), fue menor en los ratones tratados con DSS/AOM, en comparación con los animales tratados solamente con DSS para inducirles colitis aguda y crónica (Ver Figuras 4.16B y 4.20B). Por otra parte, se constató que la mayoría de los animales permanecieron vivos después de 2 meses de tratamiento, no existiendo diferencias en la supervivencia entre ambas cepas de estudio (Figura 4.22B).

El estudio del acortamiento de la longitud del colon, así como del aumento del peso del colon y puntuación del daño macroscópico (Figura 4.22C), revelaron resultados similares a los observados en ratones tratados con DSS. Se observó acortamiento de la longitud del colon en ratones wt con respecto a sus controles sanos y en comparación con ratones deficientes en GzmA. El peso del colon también aumentó significativamente en los ratones wt en comparación con sus controles no tratados y con respecto a los ratones deficientes en GzmA. En los GzmA^{-/-} también aumentó el peso del colon con respecto a sus controles sanos pero sin diferencias significativas. En la necropsia, se analizó el daño visible en el colon para establecer una puntuación macroscópica, basada en el edema, la diarrea, el sangrado y otros parámetros. Los resultados mostraron mejora significativa del daño macroscópico a nivel intestinal en los ratones GzmA^{-/-} al compararlos con los ratones wt, ambos tratados con DSS/AOM.

Resultados y Discusión

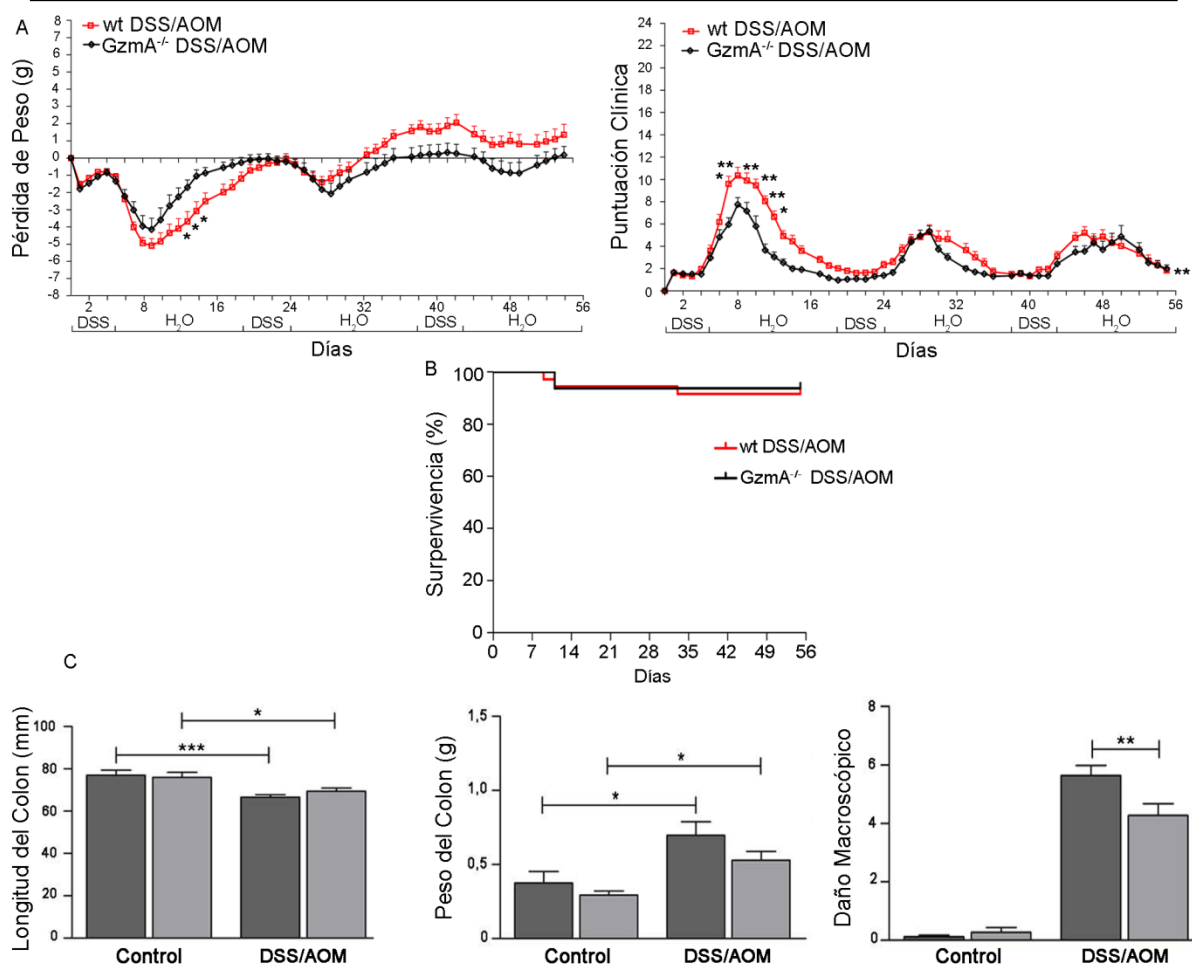


Figura 4.22 Evaluación de la puntuación clínica, daño macroscópico y supervivencia en ratones tratados con DSS/AOM. Se indujo CCR en ratones wt y en ratones GzmA^{-/-} como se describe en los materiales y métodos. A, Se evaluó la pérdida de peso y la puntuación clínica cada 1-2 días. Los datos se presentan como media \pm SEM de 33 (wt) y 26 (GzmA^{-/-}) réplicas biológicas realizadas en 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de dos vías con la prueba posterior de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. B, se evaluó la supervivencia. Las curvas de supervivencia corresponden a 31 (wt) y 24 (GzmA^{-/-}) réplicas biológicas (ratones individuales) realizadas en 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de log-rank. C, Al final del estudio, los animales se sacrificaron, el colon se midió, se pesó y se evaluó el daño visible del colon. Los datos se presentan como media \pm SEM de 31 (wt) y 24 (GzmA^{-/-}) réplicas biológicas en 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.2.8 Evaluación del daño histológico, de los tumores y del grado tumoral

Para evaluar el papel de GzmA en el desarrollo de CAC, se cuantificó, post mortem, la incidencia, el número y el diámetro de los tumores observados macroscópicamente. Como se muestra en la figura 4.23A, la incidencia de tumores fue significativamente mayor en ratones wt que en ratones GzmA^{-/-}.

Además, se comprobó que el número y tamaño de los tumores macroscópicos, que desarrollaron los $GzmA^{-/-}$, fue significativamente menor, al compararlos con los ratones wt. Los animales tratados solo con AOM no desarrollaron tumores al final del experimento (día 56) y aproximadamente el 1 % de los animales tratados con DSS desarrollaron tumores, lo que subraya la importancia de la inflamación en el progreso del CCR.

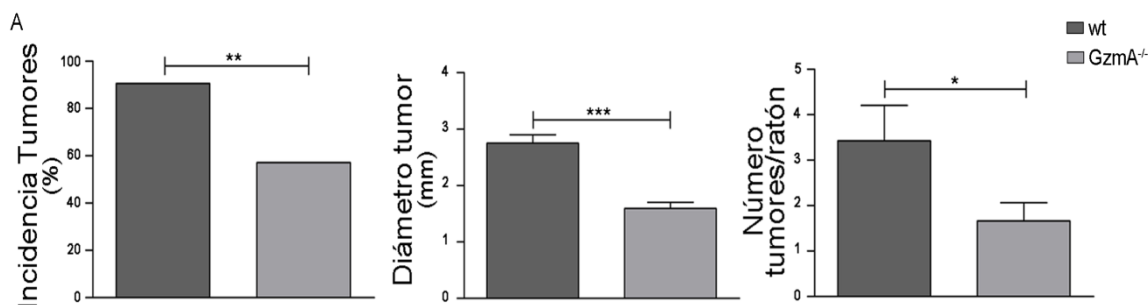


Figura 4.23A Evaluación del desarrollo del CCR en ratones tratados con DSS/AOM. Se indujo CCR en ratones wt y $GzmA^{-/-}$ como se describe en los materiales y métodos. Al final del estudio, los animales se sacrificaron. A, Se evaluó el número de animales con tumores (incidencia de tumores), el diámetro de los tumores y el número de tumores por ratón. Los datos se presentan como media \pm SEM de 31 (wt) y 24 ($GzmA^{-/-}$) réplicas biológicas en 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-test no pareado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

El análisis histopatológico de las secciones de colon teñidas con H&E confirmó las diferencias observadas a nivel macroscópico. En el colon de ratones wt tratados con DSS/AOM se observó infiltración de células inflamatorias en la mucosa y edema de la submucosa, así como daño en las criptas. En contraste, el colon de ratones $GzmA^{-/-}$ tratados con DSS/AOM mostró un número reducido de células infiltrantes, menos lesiones en la mucosa y menos edema, al compararlos con los wt. Durante el análisis histológico, se constató que cada parámetro individual evaluado (inflamación, daño en las criptas y extensión del daño), así como el puntaje total, fueron significativamente más bajos en ratones $GzmA^{-/-}$ que en ratones wt (Figura 4.23B).

Este análisis además, reveló el papel crítico de la $GzmA$ en los diferentes pasos del desarrollo del tumor, es decir, en la transición de un epitelio sano a displasia y luego a carcinoma. Como se muestra en la figura 4.23C, al final del experimento (56 días), todos los ratones wt tratados con DSS/AOM presentaron transformación de células epiteliales, aunque en diferentes etapas, como se

indica en las imágenes representativas. Hubo un 50 % de ratones wt que presentaron adenocarcinoma, un 30 % presentó displasias de bajo grado y un 20 % displasias de alto grado. En contraste, el 20 % de los ratones $GzmA^{-/-}$ no mostraron CCR o displasias en ningún grado y solo el 20 % progresó a adenocarcinoma. Se observaron diferencias similares cuando se analizó el desarrollo del tumor en etapas anteriores (días 28 y 47 después de iniciar el tratamiento con DSS/AOM). En el día 47, el 40 % de los ratones $GzmA^{-/-}$ no presentaron ningún tipo de displasia y el resto solo presentó displasia de diferentes grados pero no CCR. En contraste, todos los ratones wt ya presentaban displasia y el 13 % carcinoma. El día 28, se observó displasia en solo el 37 % de los ratones $GzmA^{-/-}$, mientras que en el 60 % de los ratones wt ya mostraban displasia de diferente grado. Estos resultados confirman que la $GzmA$ desempeña un papel crítico en el desarrollo de CCR y probablemente en la perpetuación del estado canceroso.

Cuando el experimento se repitió usando ratones hermanos de la misma camada se encontraron resultados que confirmaron los ya anteriormente expuestos, es decir, los ratones $GzmA^{-/-}$ presentaron menos síntomas clínicos y de daño intestinal, además desarrollaron menos tumores, que los ratones $GzmA^{+/+}$ (Figura 4.24). Por lo tanto, una vez más se descartó la posible influencia de los antecedentes genéticos y medio ambientales en los resultados obtenidos.

Resultados y Discusión

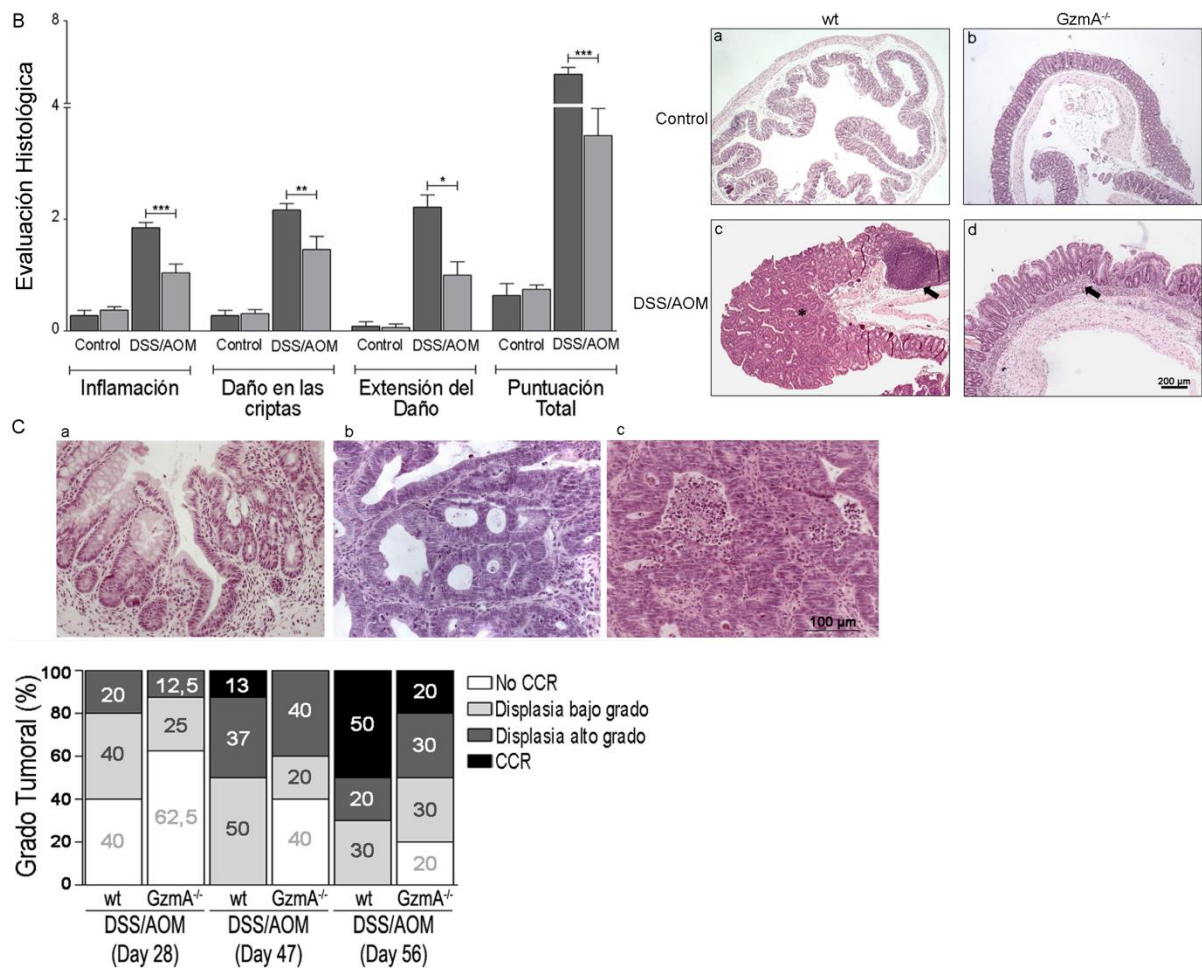


Figura 4.23B-C Evaluación del desarrollo del CCR y del daño histológico en ratones tratados con DSS/AOM. Se indujo CCR en ratones wt y GzmA^{-/-} como se describe en los materiales y métodos. Al final del estudio, los animales se sacrificaron. B, Se tomaron muestras de colon y se procesaron para histopatología. El gráfico representa la puntuación de cada parámetro individual y la puntuación total. Los datos se presentan como media ± SEM de al menos 5 wt y 5 GzmA^{-/-}. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Las microfotografías (derecha), representativas de secciones de tejido de colon teñidas con H&E, muestran ratones wt (a) y GzmA^{-/-} (b) no tratados, ratones wt (c) y GzmA^{-/-} (d) tratados con DSS/AOM (barras de escala representan 200 µm). C, Se muestran microfotografías representativas de displasia de bajo grado (a), displasia de alto grado (b) y carcinoma (c). Se estableció el grado tumoral por ratón en animales wt y GzmA^{-/-}. La gráfica representa el porcentaje de ratones con el grado de tumor indicado (el mayor grado de tumor encontrado) dentro de cada grupo.

Resultados y Discusión

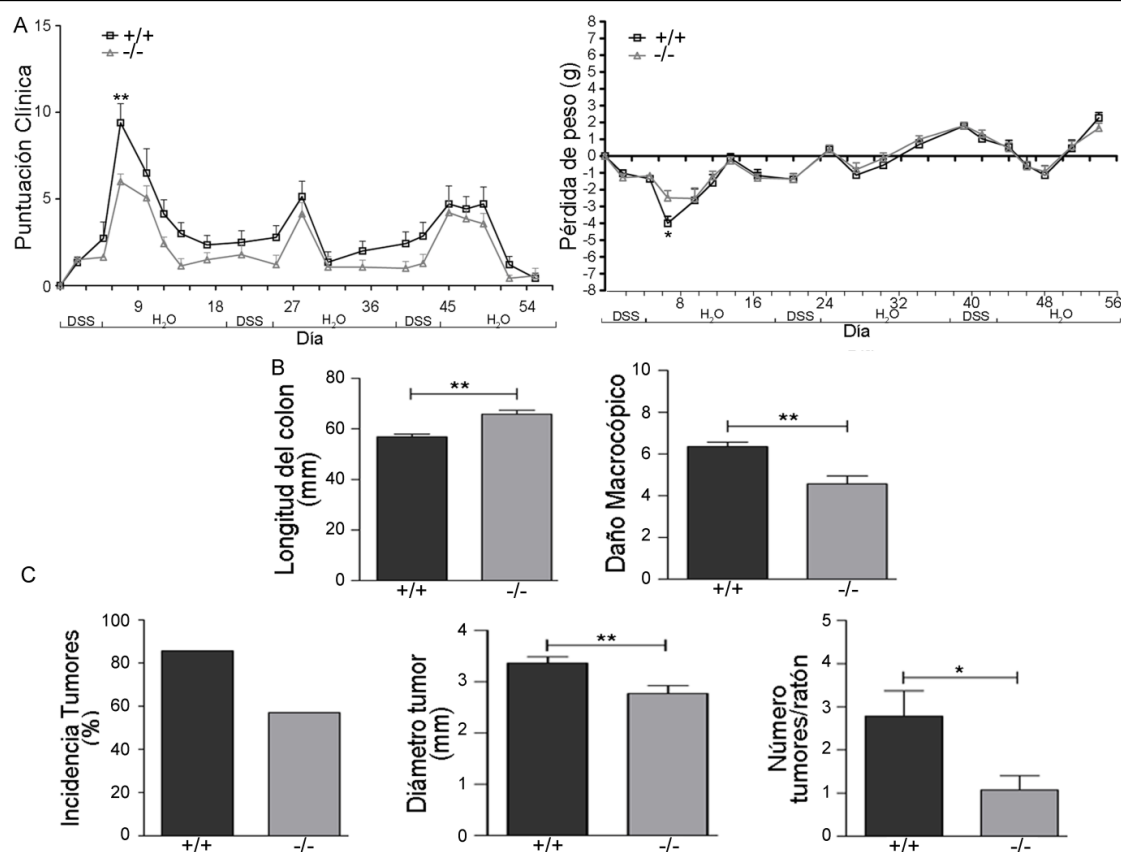


Figura 4.24 Evaluación de la puntuación clínica, daño macroscópico y desarrollo de CCR en ratones hermanos de la misma camada tratados con DSS/AOM. Se indujo CCR en ratones macho hermanos de camada con genotipo homocigoto para Gzma (+/+ y -/-). A, Se evaluó la puntuación clínica y el cambio de peso cada 3 días. Los datos se presentan como media \pm SEM de 15 (+/+) y 14 (-/-) réplicas biológicas realizadas en un experimento. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de dos vías con la prueba posterior de Bonferroni. * $p < 0,05$. B, Al final del estudio los animales se sacrificaron, se midió el colon y se puntuó el daño visible en el colon, como se describe en los materiales y métodos. C, En la necropsia, se evaluó el número de animales con tumores (incidencia tumoral), el diámetro del tumor y el número de tumores por ratón. Los datos se presentan como media \pm SEM de 15 (+/+) y 14 (-/-) réplicas biológicas realizadas en un experimento. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-test no pareado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.9 Estudio de marcadores de EMT y proliferación tumoral

La EMT es esencial durante el desarrollo embrionario, pero también desempeña un papel importante en el inicio, la progresión y la metástasis del cáncer (400, 636). El desarrollo de CCR es un proceso donde las células epiteliales normales se transforman en criptas aberrantes, luego en adenomas, carcinomas *in situ* hasta sufrir metástasis.

El efecto de la deficiencia de Gzma en la EMT se evaluó empleando algunos marcadores específicos como vimentina, β -catenina y SNAIL-1. A su vez, se evaluó el nivel de proliferación de células epiteliales analizando los

marcadores ki67 y p-STAT3 (400, 402). Para llevar a cabo este objetivo, se sacrificaron animales el día 28 (4 semanas) del tratamiento con DSS/AOM, momento éste en el que comienza la EMT, según estudios anteriores (637, 638). Como se muestra en las microfotografías mostradas en la figura 4.25A, se observó una clara disminución de la capacidad invasiva (EMT) y proliferativa de las células epiteliales de los animales $GzmA^{-/-}$ tratados con DSS/AOM en comparación con los wt tratados de igual forma. La tinción con anti-vimentina mostró un gran número de células positivas, especialmente en las áreas de displasia, en animales wt tratados con DSS/AOM. Por el contrario, en ausencia de $GzmA$ se redujo significativamente la cantidad de células positivas para vimentina en las capas de la mucosa y submucosa. De la misma manera, los animales wt, expuestos a DSS/AOM, mostraron un aumento significativo de la β -catenina citoplasmática y nuclear en células epiteliales mientras que, en los animales $GzmA^{-/-}$, la tinción con β -catenina estaba restringida principalmente a la membrana celular, correspondientes a la localización de las uniones intercelulares, comportamiento muy similar al observado en los controles no tratados. De manera análoga, la expresión de SNAIL-1 se incrementó en ratones wt tratados con DSS/AOM, mostrando una alta positividad en la lámina propia y el tejido conectivo. En ratones $GzmA^{-/-}$, el patrón de tinción fue similar al de los ratones controles no tratados, con muy pocas células positivas en el tejido conectivo. El factor de transcripción p-STAT3 también estaba incrementado en células de la mucosa y submucosa de los animales wt tratados con DSS/AOM, con muchas células positivas en las áreas de displasia. Mientras que se observó una clara disminución de la positividad en el grupo $GzmA^{-/-}$ tratado con DSS/AOM, aunque en este caso el número de células positivas sí se incrementó con respecto a los $GzmA^{-/-}$ controles sanos. Finalmente, se pudo ver un aumento del número de células proliferativas con el marcador Ki-67. En animales wt, la positividad no se limitó al área basal de las glándulas colónicas de los animales tratados con DSS/AOM, ya que en ciertos casos se extendió hasta la zona apical. Por el contrario, los animales deficientes en $GzmA$, tratados con DSS/AOM mostraron este marcador restringido al área basal, de manera similar a los animales usados como controles sin tratar. Cabe resaltar que la expresión

de todos estos marcadores en animales control sin tratar, tanto wt como $GzmA^{-/-}$, fue similar. Además, es importante señalar que se observó una fuerte positividad de Ki-67, vimentina y SNAIL-1 en células similares a fibroblastos asociados con tejido conjuntivo solo en los ratones wt tratados con DSS/AOM, lo que se corresponde con los cambios observados en el tejido conectivo antes de que ocurra EMT (400).

El número de células positivas por campo para vimentina, β -actina, SNAIL-1 y p-STAT3 y el porcentaje de núcleos teñidos positivamente para Ki-67, mostró diferencias entre los animales wt y $GzmA^{-/-}$, diferencias que fueron estadísticamente significativas en todos los casos (Figura 4.25B).

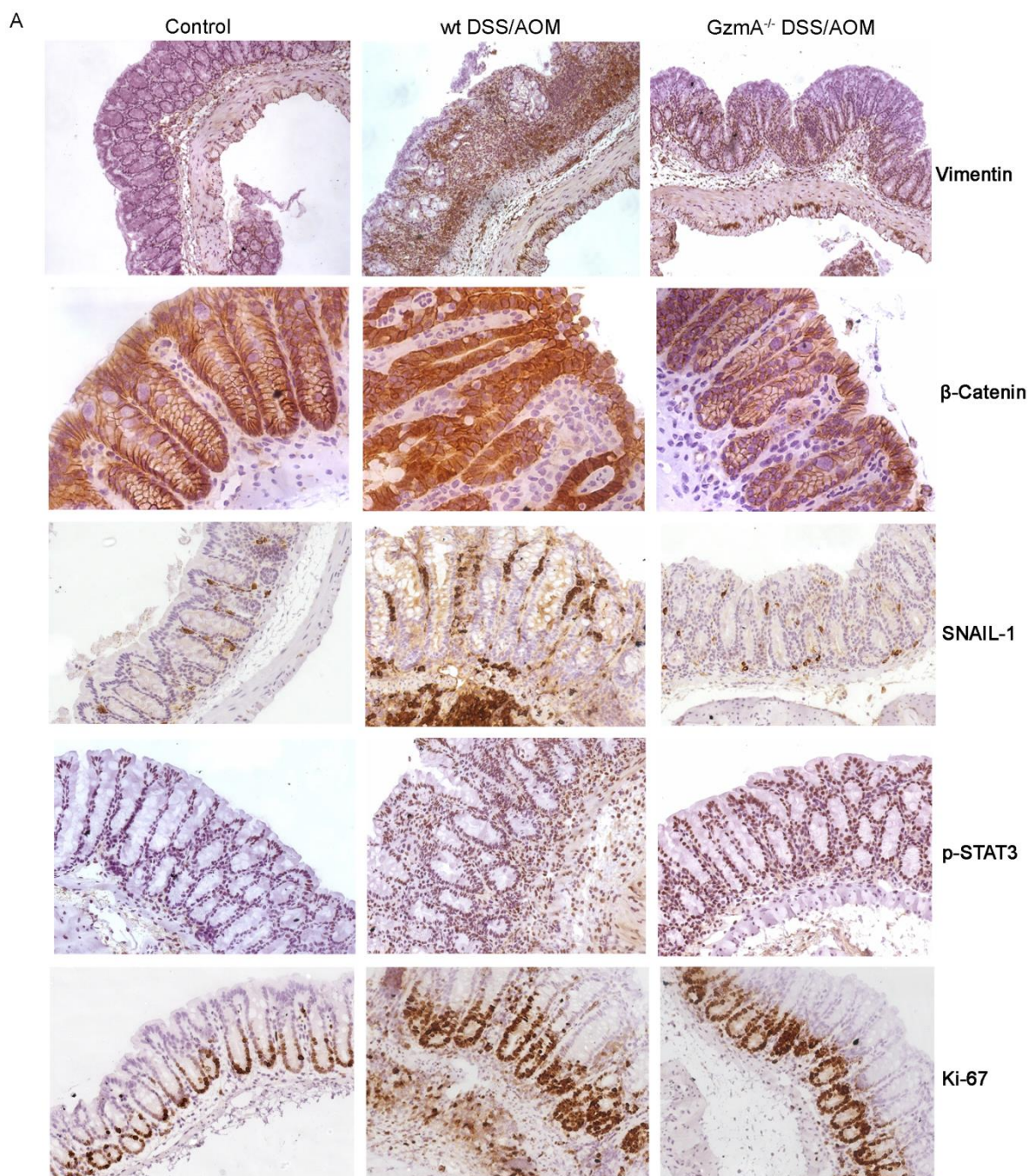


Figura 4.25A. Estudio de marcadores de EMT y proliferación tumoral en ratones tratados con DSS/AOM. Un grupo de ratones se trataron con DSS/AOM y se sacrificaron el día 28 después de iniciado el tratamiento. Se tiñeron secciones de tejido del colon con anticuerpos contra vimentina, β-catenina, SNAIL-1, p-STAT3 y Ki-67. La figura muestra microfotografías representativas de la evaluación de IHQ.

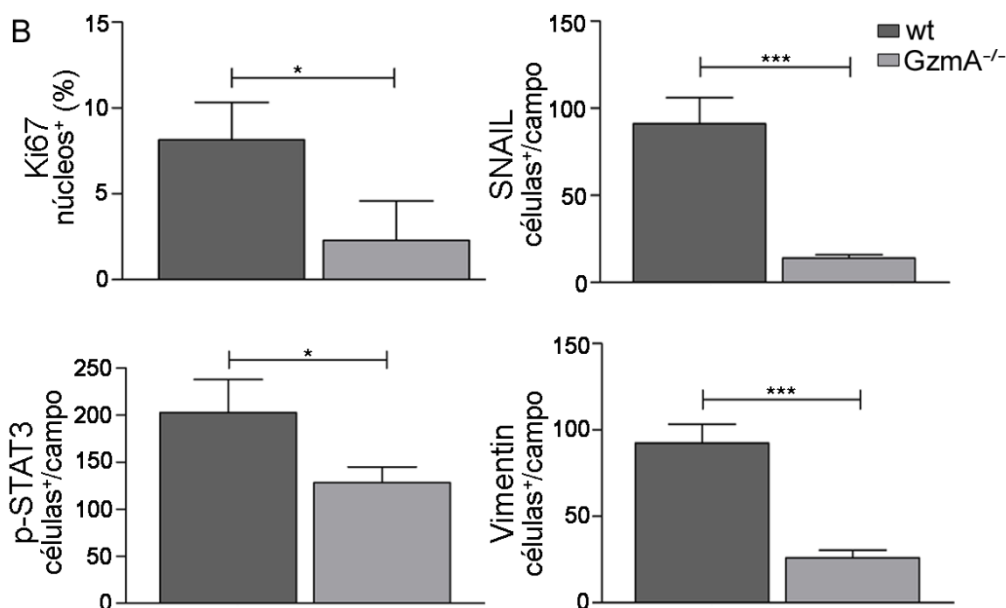


Figura 4.25B. Estudio de marcadores de EMT y proliferación tumoral en ratones tratados con DSS/AOM. Los gráficos representan el porcentaje de núcleos positivos para Ki-67 y el número de células positivas por campo para SNAIL-1, p-STAT3 y vimentina entre todas las células de la cripta. Los análisis se realizaron cuantificando todas las células en cinco campos aleatorios por portaobjetos (3 portaobjetos por animal) como se indica en los métodos. Los datos se presentan como media \pm SEM de al menos 5 réplicas biológicas (ratones individuales). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-test no pareado. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.2.10 Estudio de la inflamación y la actividad de la COX-2 en explantes de cultivo de tejido de colon de ratones wt y GzmA^{-/-} durante el desarrollo del CCR

La inflamación crónica, que conduce a CAC, se caracteriza por la producción de citoquinas proinflamatorias que pueden inducir mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, inestabilidad genómica y EMT a través de diferentes mecanismos (6, 395, 639). Por lo tanto, se decidió analizar si la disminución de EMT y CAC, observado en animales GzmA^{-/-} tratados con DSS/AOM, también se correlacionaba con una menor respuesta proinflamatoria, tal como se observó durante la colitis crónica y aguda inducida por DSS (ver Figuras 4.18 y 4.21). Para ello se cuantificaron, a partir del sobrenadante del cultivo de explantes de tejido de colon, los niveles de algunas citoquinas proinflamatorias, que están involucradas en CAC (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-17) y de la citoquina antiinflamatoria IL-10, tanto en el colon proximal como en el distal. En general se observó que, los niveles de citoquinas pro-inflamatorias

eran más altos en el colon proximal en comparación con el colon distal. A nivel proximal, todas las citoquinas analizadas aumentaron significativamente en animales wt en comparación con los ratones $GzmA^{-/-}$. En el colon distal, las citoquinas pro-inflamatorias también aumentaron significativamente en los ratones wt tratados con DSS/AOM en comparación con los ratones wt no tratados que se usaron como controles, sin embargo, solo hubo diferencias significativas entre ambas cepas para las citoquinas $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ e $IL-6$. Por otro lado, la $IL-10$, una citoquina antiinflamatoria con papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (473, 474), se redujo significativamente en ratones wt en comparación con los ratones $GzmA^{-/-}$, tanto en el colon proximal como en el distal. En contraste con lo observado en ratones wt, solo la $IL-17$ aumentó significativamente en animales $GzmA^{-/-}$ tratados con DSS/AOM, en comparación con sus controles no tratados (Figura 4.26A-B).

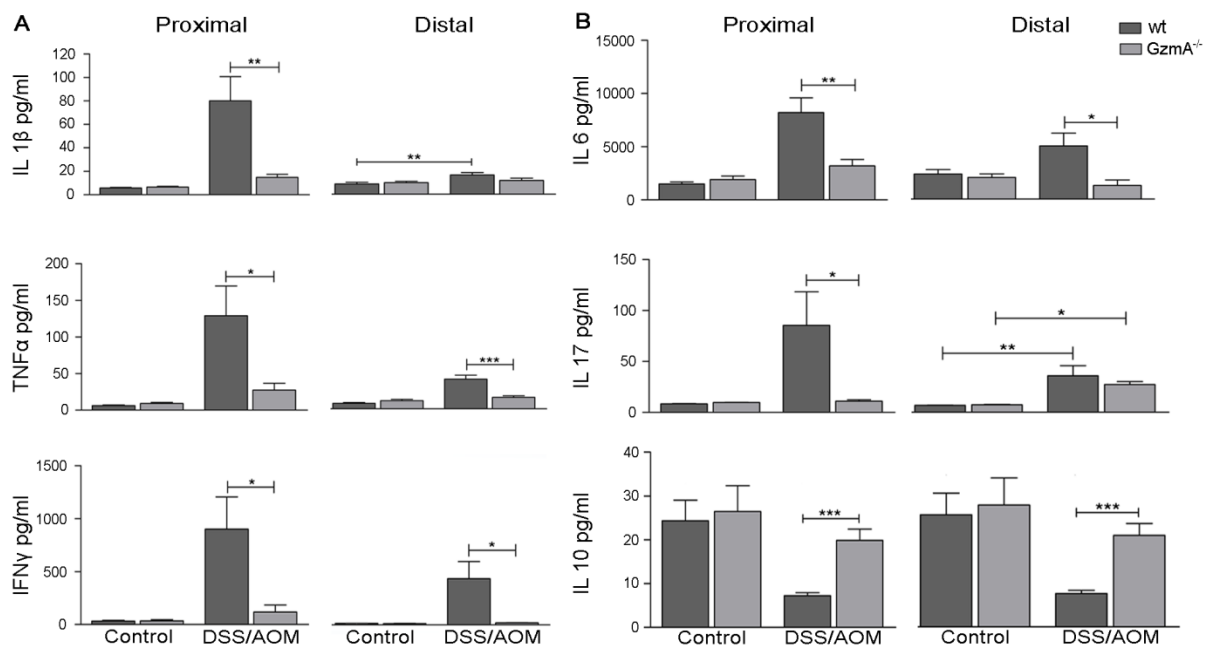


Figura 4.26 La inflamación está reducida en el tejido del colon de ratones con CAC inducida por DSS/AOM. Se indujo CCR en ratones wt y deficientes en $GzmA$ como se describe en los materiales y métodos. Los ratones se sacrificaron el día 56 de tratamiento y se cultivaron muestras de tejido de colon (30 mg) durante 24 h. Se recogió el sobrenadante y se cuantificaron los niveles de $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, $IL-6$, $IL-17$ e $IL-10$ mediante ELISA, en el colon proximal y distal. Los datos se presentan como media \pm SEM de al menos 10 réplicas biológicas realizadas en 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Existen numerosas evidencia clínica y experimentales que indican que las alteraciones en la expresión de la ciclooxygenasa-2 (COX-2) y su efector inflamatorio, la prostaglandina E2 (PGE2), desempeñan un papel fundamental en la tumorigénesis colorrectal (497). En este estudio se evaluó la expresión de mRNA de COX-2, mediante RT-qPCR, en muestras de tejido de colon, además se cuantificaron los niveles de PGE2, mediante ELISA, en cultivos *ex vivo* de tejido de colon distal. Como se observa en la figura 4.27, la expresión de mRNA de COX-2 y la producción de PGE2 aumentaron significativamente en ratones wt en comparación con los controles no tratados y en comparación con los ratones *GzmA*^{-/-}, lo que confirma que la actividad de COX-2 también se redujo en ausencia de *GzmA*.

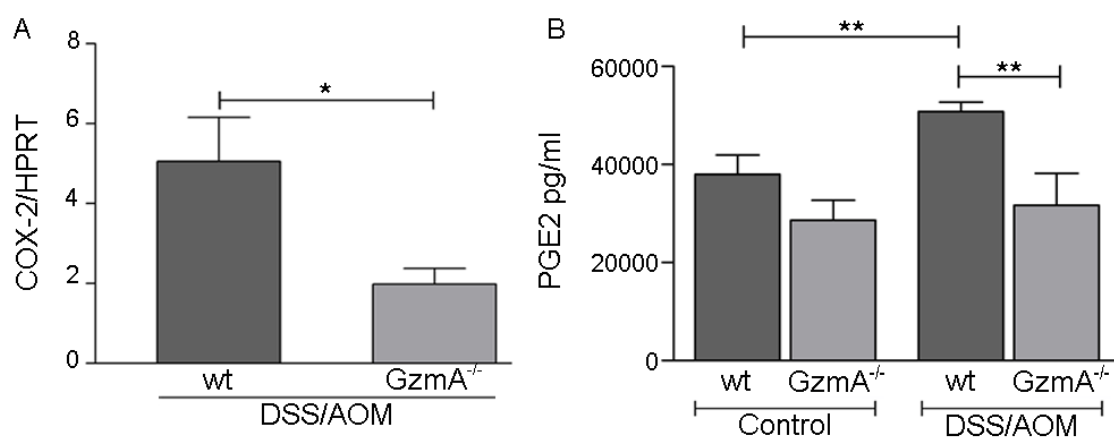


Figura 4.27 Estudio de la actividad COX-2 en ratones con CAC inducida por DSS/AOM. Se indujo CCR en ratones wt y deficientes en *GzmA* como se describe en los materiales y métodos. Los ratones se sacrificaron el día 56 de tratamiento. A, Se determinaron los niveles de expresión de mRNA de COX-2 mediante RT-qPCR. La expresión de COX-2 se normalizó con respecto a la cantidad de mRNA de HPRT (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa). Los datos se presentan como media \pm SEM de 4 réplicas biológicas (ratones individuales) realizadas en 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-test no pareado. * p < 0,05. B, Se cuantificaron los niveles de PGE2 mediante un ELISA del sobrenadante del cultivo *ex vivo* de tejidos de colon. Los datos se presentan como media \pm SEM de al menos 10 réplicas biológicas (ratones individuales) realizadas en 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. ** p < 0,01.

4.2.11 Papel de la microbiota intestinal en el CCR *in vivo*

La microbiota juega un papel importante en la inflamación intestinal y el desarrollo de CCR (547, 548, 640). En este estudio se realizó el análisis de la microbiota intestinal de ratones wt y *GzmA*^{-/-}, empleando la técnica de secuenciación de la subunidad 16S del rDNA. La subunidad 16S del rDNA es

considerada como la diana universal para la identificación bacteriana, por sus características y propiedades, lo que permite la caracterización taxonómica de las bacterias, llegando a discernir hasta nivel de género y en algunos casos (641, 642).

Los resultados obtenidos revelaron que ambas cepas de ratones presentan una composición casi idéntica de microbiota intestinal bacteriana a nivel de género (Figura 4.28), descartando así que la mayor resistencia al desarrollo del CAC, observada en los ratones $GzmA^{-/-}$, se deba a diferencias en la composición del microbioma intestinal. La diversidad bacteriana se estimó utilizando los índices de Shannon y Chao1, los que mostraron valores similares en ambas cepas (Figura 4.28A).

Este hallazgo era esperado, no solo por el comportamiento observado en los ratones hermanos de la misma camada, sino también porque estudios recientes indican que los ratones alojados en la misma instalación animal contienen microbiota idéntica, como consecuencia de las mismas condiciones ambientales de alimentación y estrés (643, 644).

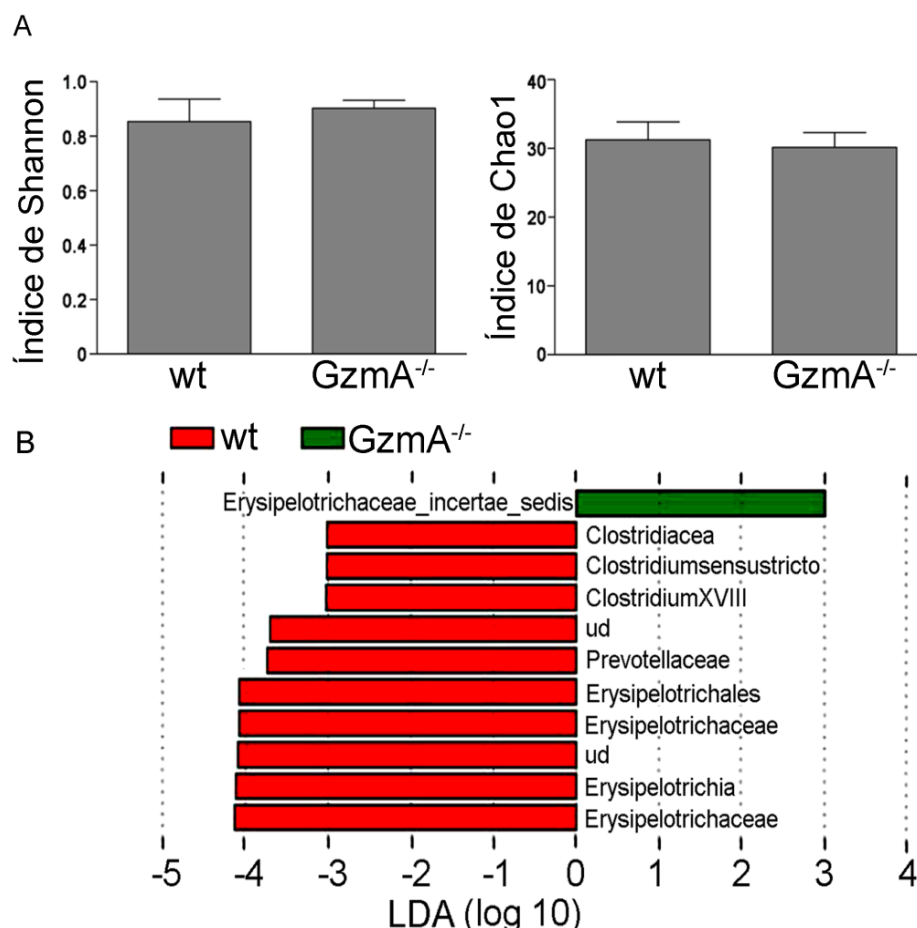


Figura 4.28 Análisis de la microbiota en heces de ratones wt y GzmA^{-/-}. A, Representación del índice de Shannon y CHAO1 (n= 3 ratones). B, Análisis discriminante lineal (LDA), efecto-tamaño (LEfSE) para identificar las diferencias entre ratones wt (rojo) y GzmA^{-/-} (verde). El gráfico muestra los taxones enriquecidos en cada cepa.

4.2.12 Estudio del papel de la Perf y la GzmB durante el desarrollo del CCR inducido con DSS/AOM

En algunos experimentos se incluyeron ratones deficientes en GzmB y Perf, además de wt y GzmA^{-/-}, para evaluar el papel de los otros dos componentes más importantes de la exocitosis granular en el inicio y desarrollo de CCR de origen inflamatorio. En estos estudios se indujo CAC con DSS/AOM estas cepas y se compararon con ratones wt y GzmA^{-/-}.

En un primer experimento se solo se evaluó la severidad de la enfermedad y la mortalidad. Como se observa en la figura 4.29A los ratones deficientes en GzmA desarrollaron una enfermedad menos grave, con puntuaciones clínicas significativamente más bajas que los wt, deficientes en Perf y GzmB. También se

pudo constatar que durante las primeras etapas de la enfermedad los ratones de las cepas wt, *Perf*^{-/-} y *GzmB*^{-/-} no presentaron diferencias en cuanto a la severidad de la enfermedad. Sin embargo, en las etapas finales del desarrollo de la enfermedad, los ratones deficientes en *GzmB* presentaron una puntuación clínica significativamente más alta, en comparación con todas las demás cepas.

Se constató, además, que solo un 15 % de los *GzmB*^{-/-} sobrevivieron después del tercer ciclo con DSS (Figura 4.29B). Este comportamiento fue inusual porque en experimentos anteriores, donde se estudiaba el comportamiento de los wt y *GzmA*^{-/-}, las muertes ocurrían fundamentalmente después del primer ciclo con DSS, coincidiendo con la fase de colitis aguda. No obstante, la muerte del 85 % de los ratones deficientes en *GzmB* al final del experimento, fue un resultado previsible porque estos animales carecen de los efectos antitumorales promovidos por la *GzmB* (645), pero tienen el efecto inflamatorio pro-tumoral atribuido en este estudio a la *GzmA*.

Se realizó un segundo experimento, esta vez para evaluar el comportamiento de los tumores y la producción de citoquinas pro-inflamatorias *ex vivo*. En este no se incluyeron *GzmB*^{-/-} debido a su alta mortalidad en las etapas finales del tratamiento y a que la severidad del procedimiento para esta cepa es muy alta. Como se observa en la figura 4.30, los ratones deficientes en *Perf* mostraron un comportamiento intermedio entre los wt y *GzmA*^{-/-} en cuanto a la producción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la IL-6, así como en cuanto al daño macroscópico a nivel de colon, el número de tumores por ratón y la incidencia tumoral. Este resultado indica que la *GzmA* ejerce sus acciones biológicas de manera intracelular y extracelular. Los resultados obtenidos en este experimento concuerdan con los obtenidos en otro estudio previo realizado por Waldner et al, en el que se observó que los ratones *Perf*^{-/-} desarrollaron menos inflamación y menor número de tumores que los wt, tratados ambos con DSS/AOM (646). Durante la deficiencia de *Perf* se reduce la producción de citoquinas pro-inflamatorias inducida por la *GzmA*, por lo tanto, disminuye la acción pro-tumoral de la proteasa.

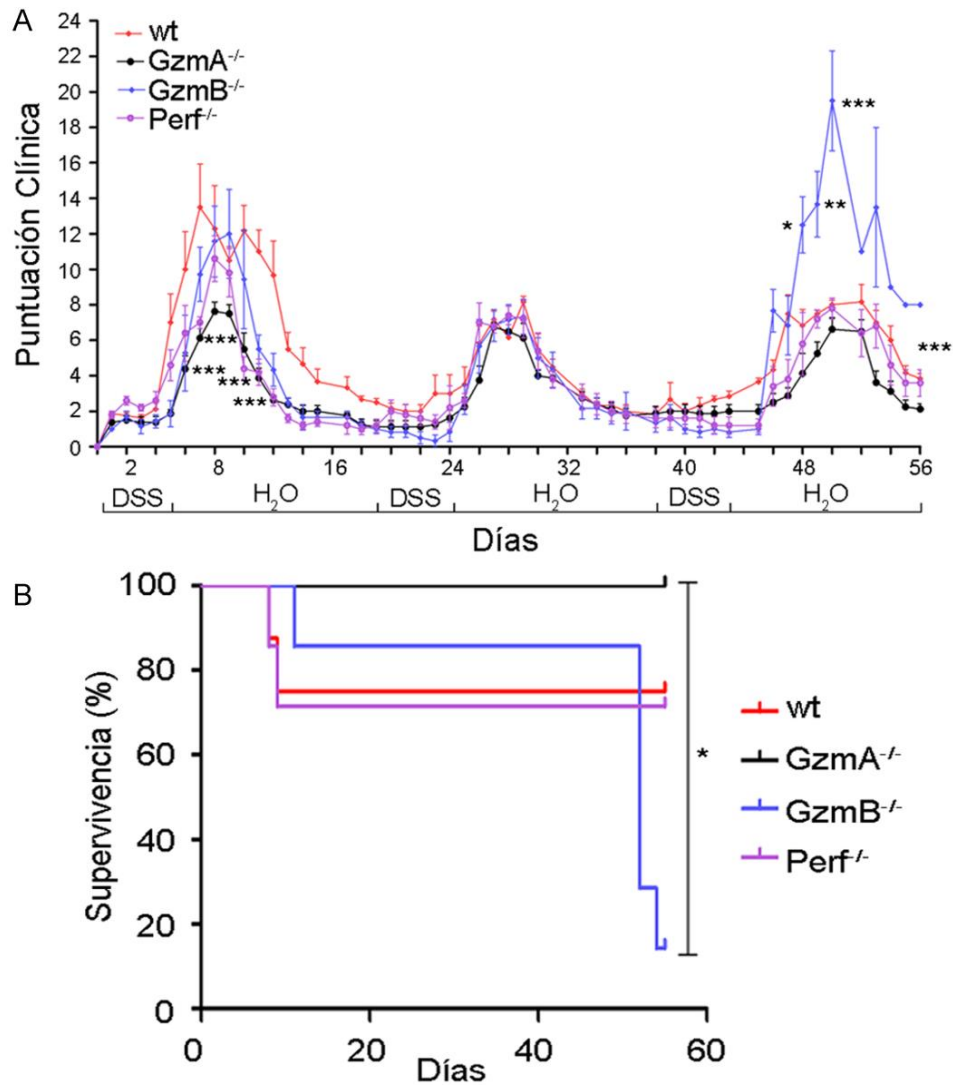


Figura 4.29 Evaluación de la puntuación clínica y supervivencia en ratones tratados con DSS/AOM. Se indujo CCR, en ratones wt y en ratones deficientes en GzmA, GzmB y Perf, como se describe en los materiales y métodos. A, Se evaluó la puntuación clínica cada 1-2 días. Los datos se presentan como media \pm SEM de 8 (wt), 8 (GzmA^{-/-}), 7 (GzmB^{-/-}) y 7 (Perf^{-/-}) réplicas biológicas en 1 experimento. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de dos vías con la prueba posterior de Bonferroni. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. B, se evaluó la supervivencia. Las curvas de supervivencia corresponden a 8 (wt), 8 (GzmA^{-/-}), 7 (GzmB^{-/-}) y 7 (Perf^{-/-}) réplicas biológicas (ratones individuales) en 1 experimento. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de log-rank. * p < 0,05.

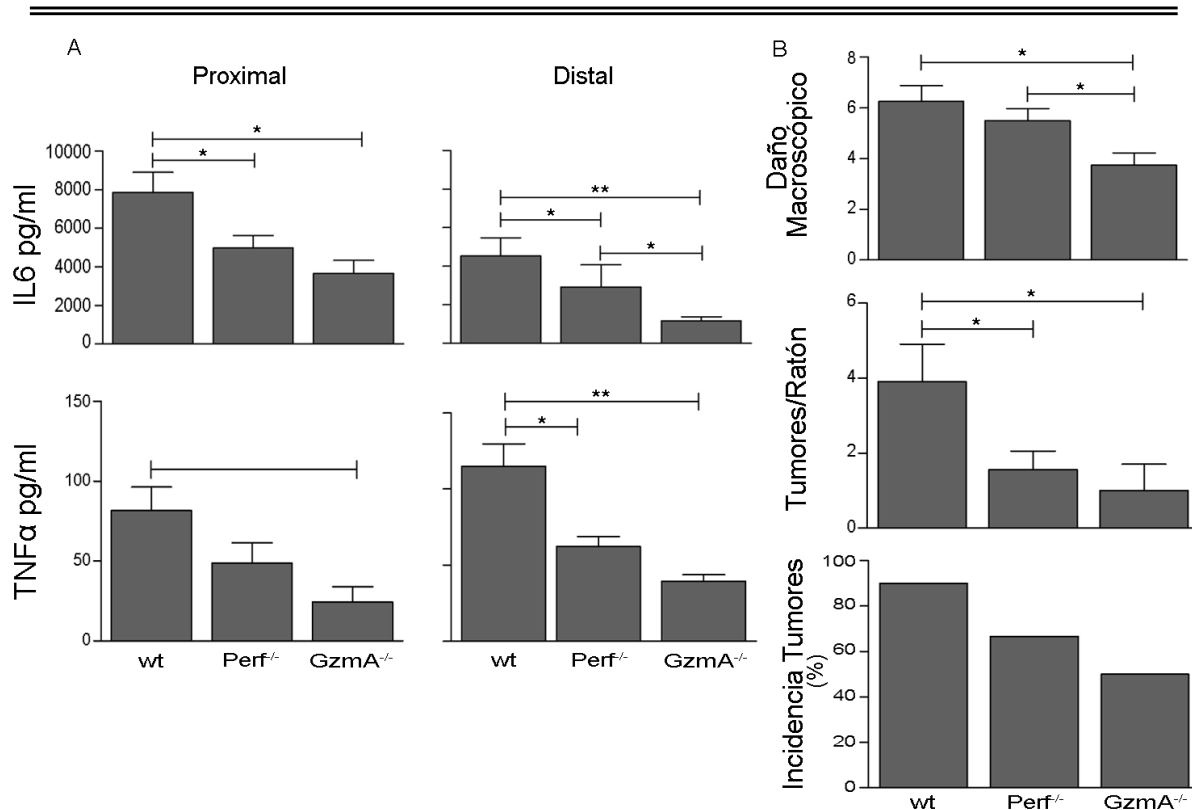


Figura 4.30 Evaluación del daño macroscópico y la producción de citoquinas en explantes de tejido de colon de ratones wt, GzmA^{-/-} y Perf^{-/-} tratados con DSS/AOM. Se indujo CCR, en ratones wt y en ratones deficientes en GzmA y Perf, como se describe en los materiales y métodos. A, Se cultivaron muestras de tejido de colon (30 mg) durante 24 h, se recogió el sobrenadante y se cuantificaron los niveles de IL-6 y TNF-α mediante ELISA, en el colon proximal y distal. B, Puntuación del daño macroscópico a nivel de colon, número de tumores e incidencia de tumores. Los datos se presentan como media ± SEM de 10 (wt), 7 (GzmA^{-/-}) y 9 (Perf^{-/-}) réplicas biológicas en 1 experimento. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. * p < 0,05; ** p < 0,01.

4.2.13 La producción de IL-6 y TNF-α inducida por GzmA extracelular en macrófagos M1 incrementa la expresión de p-STAT3 y p-NF-kB en la línea celular de CCR MC38

La infiltración de macrófagos aumenta en pacientes con CCR y durante el desarrollo del CCR inducido en ratones por DSS/AOM (647-649). Específicamente, el porcentaje de macrófagos M1 presentes en la mucosa del colon muestra un aumento marcado durante la transición de displasia a carcinoma con un aumento en la expresión de IL-6 (649), lo que sugiere que los macrófagos M1 y la IL-6 juegan un papel importante durante carcinogénesis en este modelo. Como se describió anteriormente, en este estudio observamos que tanto en la colitis crónica inducida por DSS como en el CCR inducido por

DSS/AOM, la producción de IL-6 se redujo significativamente en animales GzmA^{-/-} en comparación con animales wt (Figura 4.18 y Figura 4.26).

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se analizó si la GzmA extracelular era capaz de inducir la producción de IL-6, u otras citoquinas proinflamatorias, en macrófagos primarios. Para ello, se generaron macrófagos de fenotipo M1 a partir de la médula ósea de ratón y se estimularon con GzmA recombinante activa o GzmA inactivada con serpinb6b, un inhibidor específico de GzmA de ratón que no afecta a otras Gzms (191). Como control positivo se estimularon los macrófagos M1 con LPS de *E. coli*. Los resultados obtenidos mostraron que la adición de GzmA activa a macrófagos M1 aumentaba significativamente la producción de IL-6, en comparación con los macrófagos no estimulados. Mientras que la producción de IL-6 inducida por GzmA se redujo notablemente en presencia de serpinb6b, o cuando se usó una forma inactiva de GzmA, confirmando que se requiere actividad enzimática extracelular de GzmA para inducir la producción de IL-6 por parte de los macrófagos M1. Además, indica que este efecto no se debe a posibles contaminantes, por ejemplo LPS, que no se eliminan durante el proceso de purificación. Además, se detectó aumento de la producción de TNF- α .

Por otro lado, se analizó cómo la GzmA estimulaba la producción de IL-6 en macrófagos M1. Con este fin, se estudió si la inhibición de la vía NF-kB podría bloquear la expresión de IL-6 inducida por GzmA. Utilizando el inhibidor específico de NF-kB, Celastrol, se obtuvo una completa inhibición de la producción de IL-6 mediada por GzmA y por LPS, usado como control del bloqueo de la producción de citoquinas dependientes de NF-kB.

Teniendo en cuenta estos resultados, y el hecho de que se ha informado que IL-6 promueve la proliferación y activación de p-STAT3 en células tumorales de CCR (650), se decidió determinar si la producción de IL-6 inducida por GzmA en los macrófagos promovía la activación de p-STAT3 en la línea celular MC-38.

Las células MC-38 se co-cultivaron con sobrenadante de macrófago estimulado con GzmA recombinante de ratón, sobrenadante de macrófago estimulado con LPS o sobrenadante de macrófago no estimulado. Como control

positivo, se añadieron 50 ng/ml de IL-6 de ratón. Después de 15 minutos, las células se lisaron y la expresión de p-STAT3 se analizó por inmunotransferencia. Como se esperaba, la IL-6 aumentó la expresión de p-STAT3. No se observó esta sobreexpresión cuando las células se trataron con un anticuerpo anti-IL-6. De manera similar, la estimulación de células MC-38 con sobrenadante de macrófagos previamente estimulados con GzmA activa recombinante de ratón aumentó la fosforilación de STAT3, activación que no ocurrió cuando se bloqueó la IL-6 presente en el sobrenadante usando un anticuerpo anti-IL-6 de ratón. Por supuesto, no ocurrió lo mismo cuando se usó el isotipo control. Finalmente, la estimulación de MC-38 con sobrenadante de macrófagos estimulados con LPS de *E. coli*, un potente inductor de expresión de IL-6 en macrófagos, aumentó la expresión de p-STAT3 (Figura 4.31A). Es importante tener en cuenta que la estimulación directa de las células MC-38 con GzmA de ratón recombinante no aumentó la expresión de p-STAT3 (Figura 4.31B). Estos resultados se correlacionan con nuestros hallazgos *in vivo*, ya que en ausencia de GzmA, la expresión de p-STAT3 se redujo en el tejido de colon de ratones tratados con DSS/AOM (ver Figura 4.25A-B). Todos estos resultados indican que GzmA puede promover CCR a través de la producción crónica de IL-6 y posterior activación de STAT3.

También se estudió la expresión de p-NF-kB e IκBα en las células MC-38 lisadas y co-cultivadas con sobrenadante de macrófagos previamente expuestos a varios estímulos. Como se observa en la figura 4.31D, la estimulación de células MC-38 con sobrenadante de macrófagos previamente estimulados con GzmA activa de ratón aumentó la fosforilación de NF-kB y disminuyó la expresión de IκBα, inhibidor de la activación de NF-kB. También se constató que, la estimulación de MC-38 con sobrenadante de macrófagos pre-estimulados con LPS de *E. coli*, conducían a igual resultado. Es importante tener en cuenta que, una vez más, la estimulación directa de las células MC-38 con GzmA de ratón recombinante no aumentó la expresión de p-NF-kB, corroborando así que la GzmA podría actuar sobre macrófagos y otros tipos celulares, induciendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias, que luego activarán de forma aberrante vías oncogénicas en células tumorales.

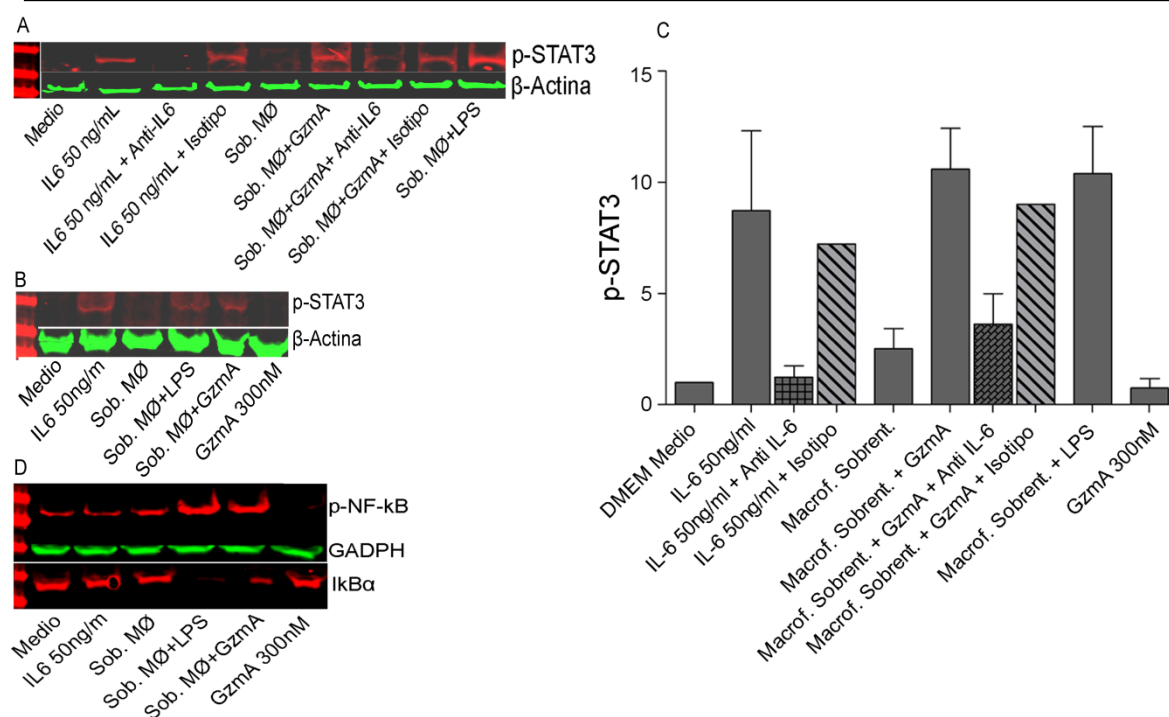


Figura 4.31 El sobrenadante de macrófagos estimulado con GzmA de ratón recombinante (300 nM) promueve la activación de STAT3 y NF-κB en la línea celular MC38. A y B, Inmunotransferencia de células MC-38 incubadas con IL-6 de ratón (50 ng/ml) o sobrenadante de macrófago estimulado con GzmA recombinante de ratón (300 nM) o sobrenadante de macrófago estimulado con LPS (100 ng/ml). Se añadieron como controles el sobrenadante de macrófagos no estimulados, el sobrenadante de macrófagos estimulado con GzmA de ratón recombinante más anti-IL-6 o isotipo (BioXCell) y la GzmA de ratón recombinante (300nM). C, Los cambios en la fosforilación de STAT3 dependiente de IL-6 se evaluaron cuantificando las intensidades de las bandas de p-STAT3 y comparando con las intensidades de las bandas de β-actina como control de carga, con la ayuda del software ImageJ. D, Inmunotransferencia de células MC-38 con los anticuerpos anti-NF-κB y anti-IκBα. Las células fueron incubadas con IL-6 de ratón (50 ng/ml) o sobrenadante de macrófago estimulado con GzmA de ratón recombinante (300 nM) o sobrenadante de macrófago estimulado con LPS (100 ng/ml). Se añadieron como controles el sobrenadante de macrófagos no estimulados y la GzmA de ratón recombinante (300nM).

4.2.14 Estudio de la inhibición *in vivo* de la IL-6 y del TNF-α durante el CAC inducido por DSS/AOM

Una vez demostrado que, *in vitro*, la IL-6 producida por los macrófagos de fenotipo M1 previamente estimulados con GzmA, promovía la activación de STAT3 en células CCR, además, que este hallazgo se correlacionaba con niveles reducidos de p-STAT3 en el colon de animales deficientes en GzmA tratados con DSS/AOM (al compararlos con los niveles de expresión en ratones wt tratados de igual manera), se decidió estudiar el papel de la inhibición de IL-6 *in vivo*, en ratones wt y deficientes en GzmA. Para ello se administraron 6 dosis de un anticuerpo anti-IL-6, o el isotipo correspondiente, cada 72 h desde el día

35 al 50 de iniciado el tratamiento con DSS/AOM. El sacrificio se realizó el día 56. Se decidió administrar el anticuerpo, o su isotipo, en este momento del tratamiento porque según nuestros resultados previos este es el período de tiempo en que comienzan a verse macroscópicamente los tumores. Los resultados, presentados en la figura 4.32, mostraron que los ratones wt tratados con anti-IL-6 presentaron disminución del daño visible en el colon a nivel macroscópico con respecto a los tratados con el isotipo control. También hubo reducción en el número de tumores por ratón y en la incidencia de tumores. Por su parte, los ratones deficientes en GzmA tratados con anti-IL-6 solo mejoraron en cuanto al número de tumores por ratón, sin afectarse la puntuación del daño a nivel macroscópico en el colon, ni la incidencia de tumores.

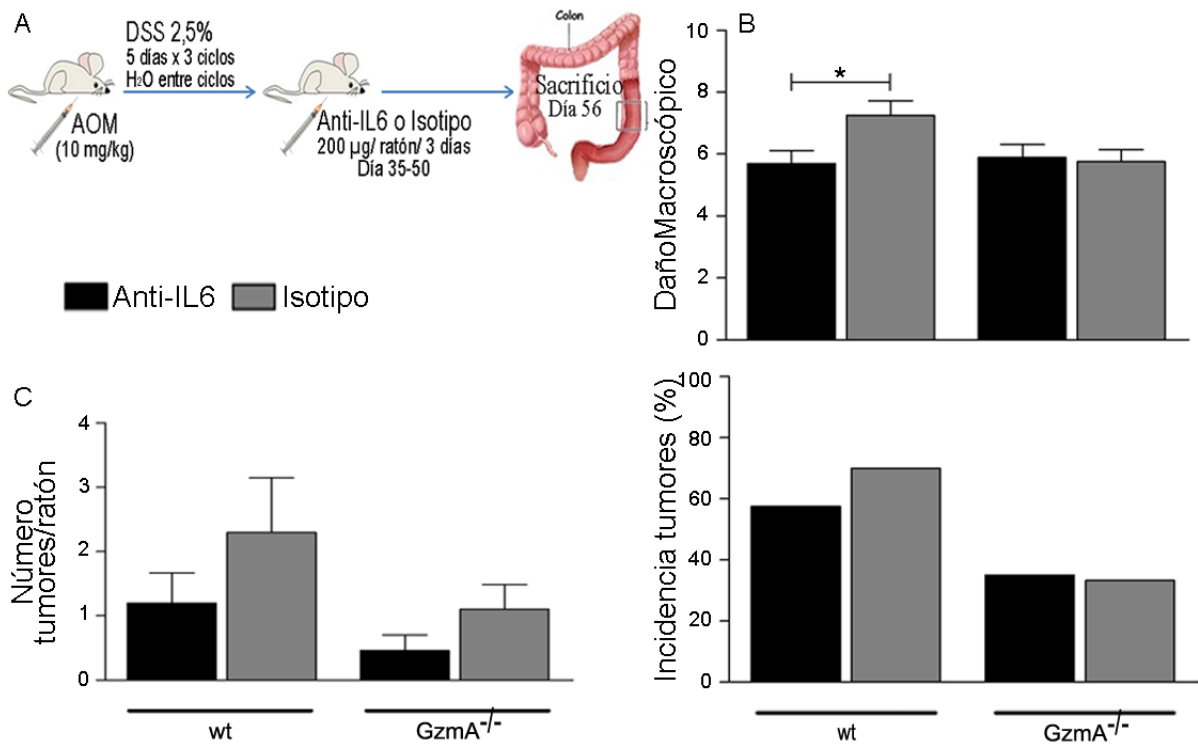


Figura 4.32 Papel del bloqueo temprano de la IL-6 en carcinogénesis de colon en ratones wt y deficientes en GzmA tratados con DSS/AOM. Se indujo CCR en ratones macho wt y GzmA^{-/-} como se describe en los materiales y métodos. Desde el día 35 hasta el día 50, se trató a un grupo de ratones con seis dosis (i.p a 200 µg/ratón) de un anticuerpo anti-IL-6 o su isotipo control (Bioxcell). Los ratones se sacrificaron a día 56. A, Descripción esquemática de la administración del anti-IL-6 o isotipo control. B, Puntuación del daño macroscópico a nivel de colon. C, Cuantificación el número de tumores por ratón, así como la incidencia de tumores. Los datos se representan como media ± SEM de 10 (wt+anti-IL-6), 10 (wt+Isotipo), 13 (GzmA^{-/-}+anti-IL-6) y 12 (GzmA^{-/-}+Isotipo) réplicas biológicas en dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante t-test no pareado. * p < 0,05.

Con el objetivo de estudiar el efecto del bloqueo de IL-6 cuando ya los tumores están formados, se realizó otro experimento en el que se administró el anticuerpo anti-IL-6, y el isotipo control, a partir del día 56 de iniciado el tratamiento. Los resultados mostraron que, tanto la puntuación del daño macroscópico a nivel de colon, como el número de tumores por ratón, disminuyeron en los wt tratados con anti-IL-6, de manera similar a lo que ocurrió usando el anterior esquema de tratamiento. Sin embargo, la incidencia de tumores fue la misma (del 100 %) en ratones wt tratados con anti-IL-6 o con el isotipo control (Figura 4.33).

En el caso de los ratones deficientes en GzmA se constató que, a diferencia de lo que ocurrió con el anterior esquema de tratamiento, tanto el daño macroscópico a nivel del colon, como el número de tumores por ratón, o la incidencia de tumores, empeoró en los tratados con el anticuerpo anti-IL-6 con respecto a los tratados con el isotipo control. Este resultado sugiere que en esta etapa del desarrollo del tumor es necesaria la existencia de cierta producción de IL-6 para ejercer una correcta inmunovigilancia y que, al igual que sucede con otras citoquinas, la contribución neta de la IL-6 al CCR puede estar determinada por el momento de su secreción o por el tipo de células inmunitarias que la secretan.

Resultados y Discusión

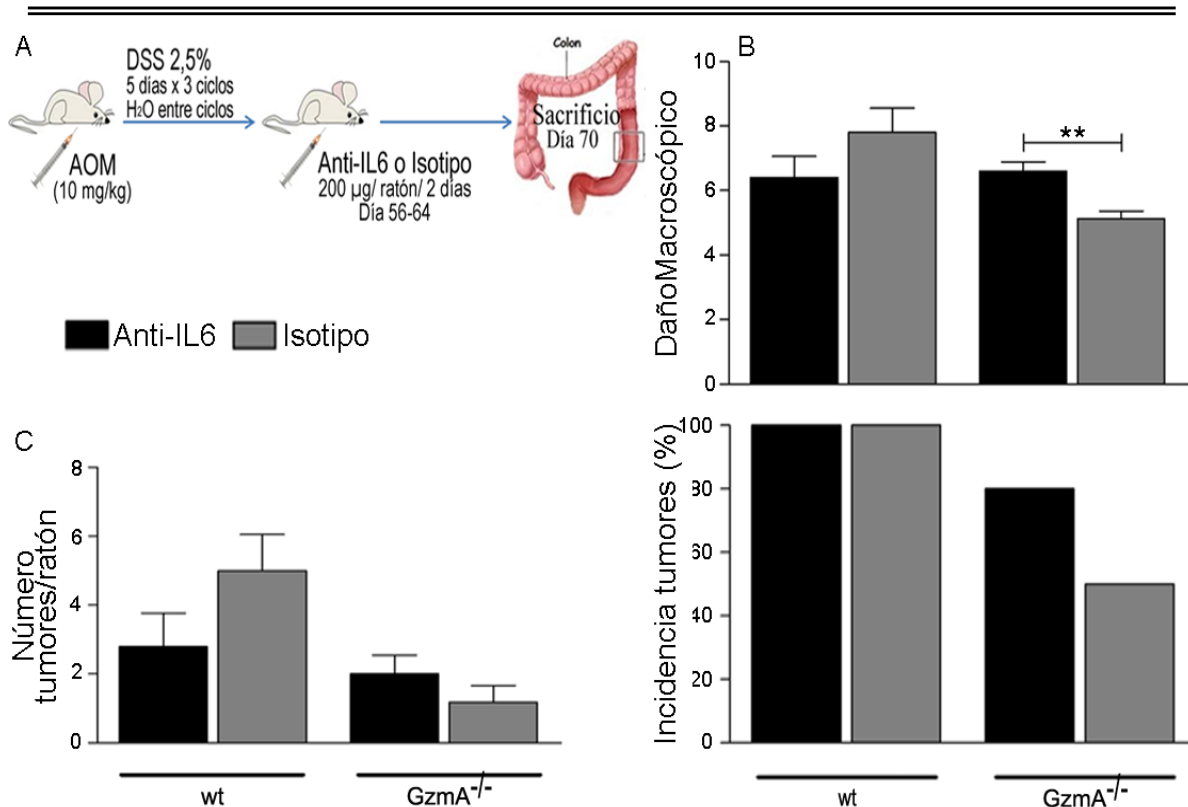


Figura 4.33 Papel del bloqueo tardío de la IL-6 en carcinogénesis de colon en ratones wt y deficientes en *GzmA* tratados con DSS/AOM. Se indujo CCR en ratones macho wt y *GzmA*^{-/-} como se describe en los materiales y métodos. Desde el día 56 (final del experimento) hasta el día 64, se trató a un grupo de ratones con cinco dosis (i.p a 200 µg/ratón) de un anticuerpo anti-IL-6 o su isotipo control (Bioxcell). Los ratones se sacrificaron a día 70. A, Descripción esquemática de la administración del anti-IL-6 o isotipo control. B, Puntuación del daño macroscópico a nivel de colon. C, Cuantificación el número de tumores por ratón, así como la incidencia de tumores. Los datos se representan como media ± SEM de 5 réplicas biológicas (ratones individuales para cada tratamiento) en un experimento. El análisis estadístico se realizó mediante t-test no pareado. ** p <0,01.

Como se ha mostrado, en este estudio se encontró que durante el tratamiento con DSS/AOM, la producción de TNF- α aumentaba en el cultivo de explantes de tejido de colon de ratones wt y *GzmA*^{-/-}, al compararlos con sus respectivos ratones control no tratados. También se constató que entre ambas cepas en estudio había diferencias significativas, siendo mayor la producción de TNF- α en los ratones wt al compararlos con los *GzmA*^{-/-} tratados de igual forma. Previamente, en un estudio realizado por Popivanova et al, se demostró que, el bloqueo de TNF- α con la administración de Enbrel (etanercept) a ratones wt, después del tratamiento con DSS/AOM, se reducía notablemente el número y el tamaño de los tumores y la infiltración colónica por neutrófilos y macrófagos (411), identificándose así al TNF- α como un mediador crucial del inicio y la

progresión de la carcinogénesis de colon asociada a la colitis, lo que además sugirió que el bloqueo de TNF- α podría ser útil en el tratamiento CAC.

Para profundizar en el papel del TNF- α en la carcinogénesis colorrectal mediada por GzmA en el modelo DSS/AOM, se bloqueó el TNF- α en ratones wt y ratones GzmA^{-/-}, posteriormente a la administración de DSS/AOM. Para ello se usó el Enbrel, un receptor señuelo del TNF- α , que se une a la proteína con alta afinidad, impidiendo la unión de esta a su receptor en la célula diana. Como se muestra en la figura 4.34, la reducción del desarrollo de CCR (número de tumores/ratón e incidenciatorumoral) en animales GzmA^{-/-} tratados con PBS (vehículo), fue similar a la observada en ratones wt tratados con el Enbrel. Este resultado apoya la relevancia de GzmA en esta patología. Además, se pudo constatar que al tratar a los ratones deficientes en GzmA con Enbrel también disminuía la incidencia y el número de tumores por ratón, lo que indica que no es exclusivo de la GzmA la capacidad para favorecer la producción de TNF- α en este modelo *in vivo*, aunque en este estudio ha quedado demostrado la importancia de la proteasa en la inducción de la producción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α .

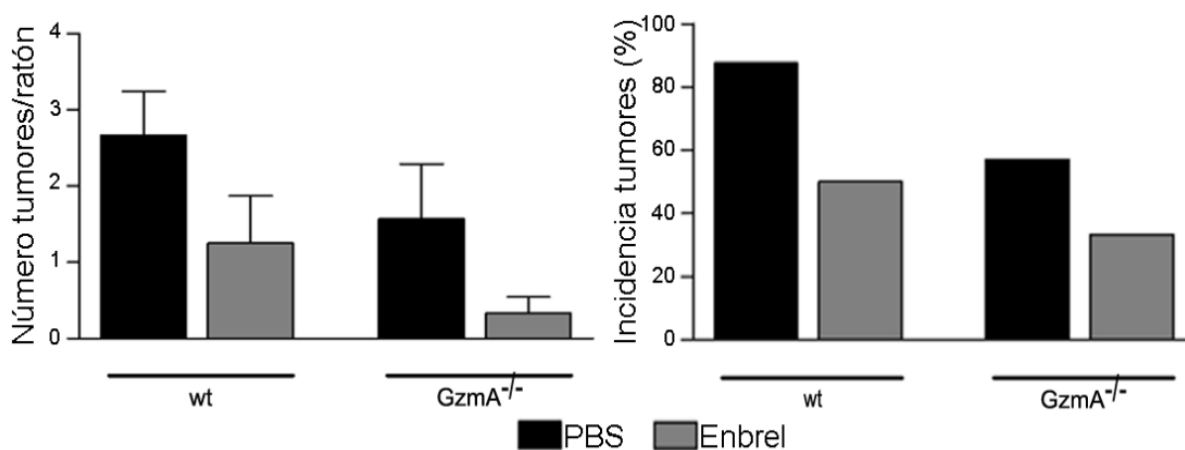


Figura 4.34 El antagonista del TNF- α , Enbrel, disminuye la carcinogénesis de colon en ratones wt y deficientes en GzmA tratados con DSS/AOM. Se indujo CCR en ratones macho wt y GzmA^{-/-} como se describe en los materiales y métodos. Desde el día 56 (final del experimento) hasta el día 60, se trató a un grupo de ratones con cinco dosis (i.p a 5 mg/kg de peso) del antagonista específico de TNF- α humano, Enbrel (etanercept). A los controles se les administró PBS. Los ratones se sacrificaron a día 67. Se cuantificó el número de tumores por ratón, así como la incidencia de tumores. Los datos se representan como media \pm SEM de al menos 8 réplicas biológicas (ratones individuales) en un experimento.

4.2.15 Estudio del papel de la inhibición terapéutica *in vivo* de la GzmA durante el CAC inducido por DSS/AOM

Una vez evaluado el papel de la GzmA en el inicio y desarrollo del CAC, se decidió analizar si la inhibición de GzmA en ratones wt, una vez que el proceso tumorigénico se había iniciado, atenuaría la inflamación y evitaría el desarrollo de CCR. Para llevar a cabo este objetivo se trataron ratones wt con un inhibidor específico de la GzmA de ratón, el serpinb6b (191). El tratamiento se administró a los 35 días después de haber iniciado el tratamiento con DSS/AOM, momento en el que ya había comenzado la transformación de células epiteliales y la displasia de colon. Como se muestra en la figura 4.35A, los niveles de las citoquinas IL-6 y TNF- α , en sobrenadantes de cultivos de explantes de colon, se redujeron significativamente al tratar ratones wt con serpinb6b, tanto en el colon distal como en el proximal, lo que confirma que la inhibición de GzmA extracelular atenúa la inflamación en los animales tratados con DSS/AOM. En comparación con los ratones tratados con serpinb6b inactivada con tripsina, los animales tratados con serpinb6b activa mostraron daño reducido en el colon, a nivel macroscópico, de una manera similar a los ratones GzmA^{-/-} (Figura 4.35B). Por otro lado, el tratamiento con serpinb6b activa también redujo significativamente la incidencia y el número de tumores en ratones wt tratados con DSS/AOM (Figura 4.35B), lo que confirma que la inhibición terapéutica de GzmA extracelular reduce el CCR de origen inflamatorio. Es importante recalcar que el tratamiento de ratones GzmA^{-/-} con serpinb6b no tuvo ningún efecto adicional sobre el desarrollo de CCR, lo que confirma la selectividad de este inhibidor.

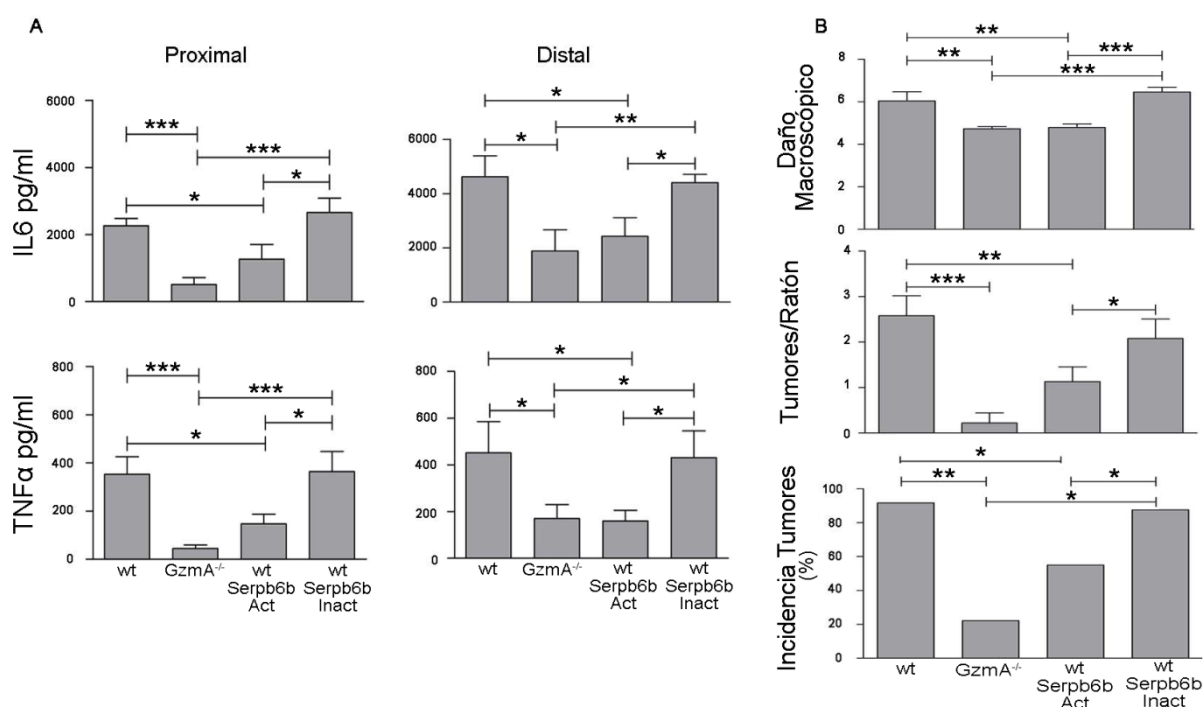


Figura 4.35 El Serpinb6b, inhibidor selectivo de GzmA, reduce el CCR y la inflamación del colon en ratones wt tratados con DSS/AOM. Se indujo CCR en ratones wt y en ratones GzmA^{-/-} como se describe en los materiales y métodos. A partir del día 35, un grupo de ratones fueron tratados con cinco dosis de serpinb6b (20 µg iv) cada dos días. Como control, un grupo de ratones se trató con serpinb6b previamente inactivado con tripsina. A, Se cultivaron muestras de tejido de colon (30 mg) durante 24 h, se recogió el sobrenadante y se cuantificaron los niveles de IL-6 y TNF-α mediante ELISA, en el colon proximal y distal. Los datos se presentan como media ± SEM de al menos 10 réplicas biológicas realizadas en 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001. B, Puntuación del daño macroscópico a nivel de colon, número de tumores e incidencia de tumores. Los datos se presentan como media ± SEM de 11 (wt), 11 (GzmA^{-/-}), 13 (wt+serpinb6b) y 14 (GzmA^{-/-}+serpinb6b) réplicas biológicas realizadas en 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

4.2.16 Correlación positiva entre expresión de GZMA e inflamación en muestras humanas de CCR

Durante el transcurso de este estudio, y con el objetivo de validar los resultados observados en el modelo murino en muestras humanas, se realizó el análisis de la expresión de mRNA en 98 muestras de pacientes con CCR en etapa 2 sometidos a cirugía (en adelante Colonomics). El trabajo se llevó a cabo en colaboración con Instituto Catalán de Oncología (ICO) y el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL). Los datos transcriptómicos se usaron para analizar si la expresión de GZMs se correlacionaba con las vías involucradas en CCR, enfocándose en las GZMA y GZMB. Primero, se realizó un

análisis de enriquecimiento de un conjunto de genes (GSEA, del inglés “Gene Set Enrichment Analysis”) para encontrar las vías y funciones celulares relacionadas con la expresión de GZMA y GZMB. Se comprobó que la GZMA se co-expresó con genes relacionados con vías inflamatorias, como respuesta a interferón γ y α , la señalización de IL-2, TNF- α (vía NF- κ B), IL-6 (vía STAT3) y otras, lo que sugiere un papel en dichas funciones. Además, de acuerdo con nuestros resultados, se detectó co-expresión con genes implicados en la EMT. Sin embargo, la GZMB se co-expresó con genes relacionados principalmente con el ciclo celular, como el punto de control G2M.

En base a estos resultados, se calculó la puntuación de inflamación para cada muestra de Colonomics (Figura 4.36A) y también para un conjunto de datos provenientes de otra base de datos (en adelante GSE39582), esta vez provenientes de 566 muestras de CCR humano (Figura 4.36B). Se observó una correlación positiva altamente significativa entre la puntuación de inflamación y la expresión de GZMA en ambos conjuntos de datos. Por el contrario, no se observó correlación entre la puntuación inflamatoria y la expresión de GZMB, lo que sugiere que la expresión de GZMA no fue una consecuencia de la activación de la respuesta inmune, lo que apoya el papel de Gzma en la regulación de la inflamación en humanos.

Para evaluar si la correlación entre la expresión de GZMA e inflamación estaba restringida a un determinado subtipo molecular de CCR (CMSs), se repitió el análisis teniendo en cuenta la clasificación (según CMSs) de cada una de las muestras de ambos conjuntos de datos. Como se observa en la figura 4.36C y D, la correlación fue significativamente positiva en todos los grupos de CMSs en ambos conjuntos de datos, con la excepción de CMS1 en Colonomics, probablemente debido al bajo número de muestras, lo que confirma que la presencia de GZMA se correlaciona con el estado inflamatorio en todos los subtipos moleculares de cáncer de colon.

La expresión de GZMA no se correlacionó con el pronóstico (hasta la recurrencia del tumor) en la cohorte de Colonomics. Sin embargo, debe indicarse aquí que la cohorte de Colonomics solo incluye pacientes en estadio 2, que en

su mayoría se recuperan después de la cirugía, siendo la tasa de recurrencia muy baja (alrededor del 20%).

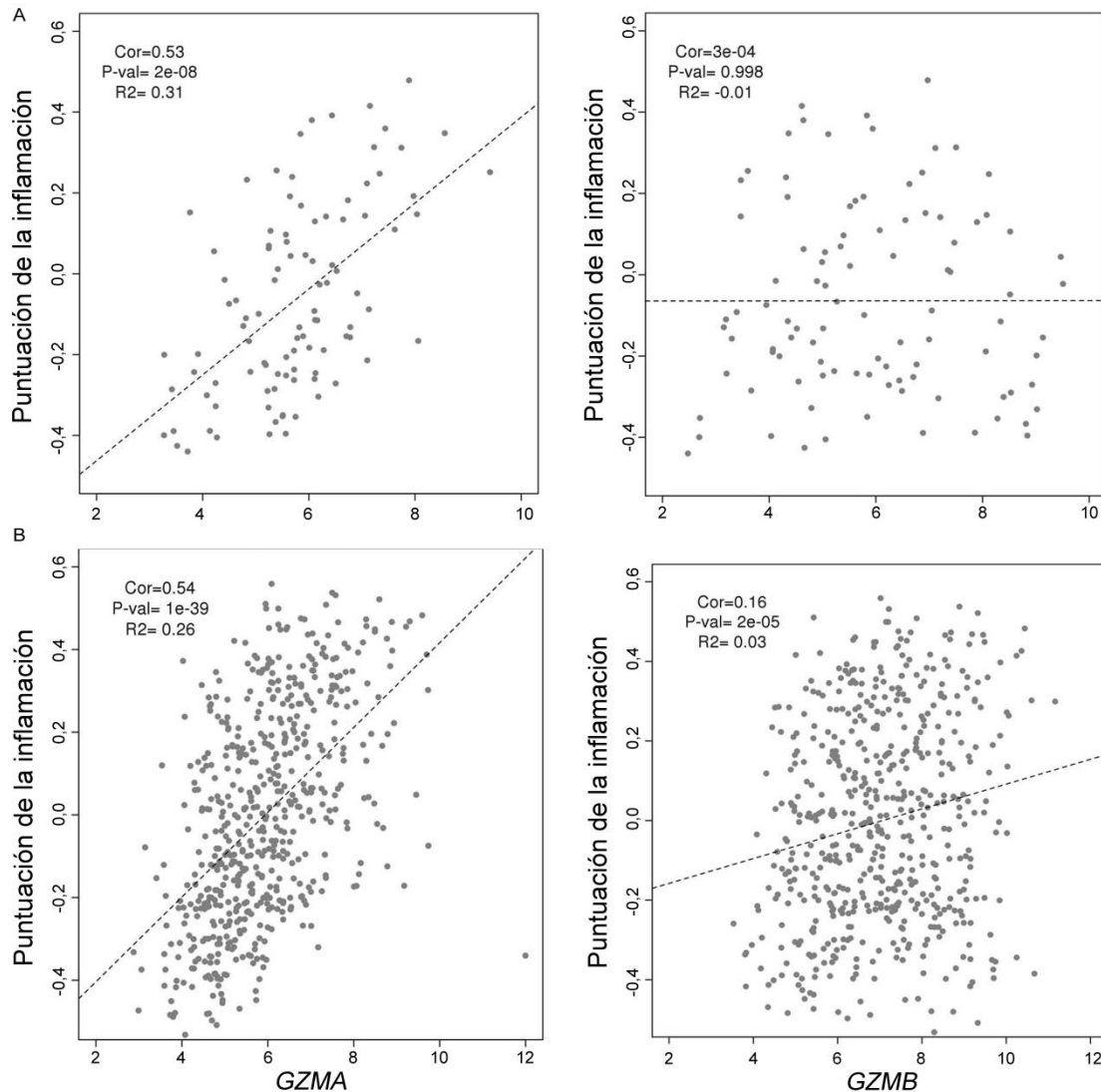


Figura 4.36A-B La expresión de GZMA se correlaciona positivamente con la puntuación de inflamación en muestras humanas independientemente de su subtipo molecular. Los niveles de mRNA de GZMA están altamente correlacionados con la puntuación de inflamación en las bases de datos de Colonomics (A) y GSE39582 (B). Por el contrario, los niveles de mRNA de GZMB no están correlacionados con la puntuación de inflamación (A y B). En todas las gráficas, se representan el valor del coeficiente de correlación de Spearman (rho), el valor p de correlación y los coeficientes R². Las líneas de regresión lineal se representan en discontinuo.

Resultados y Discusión

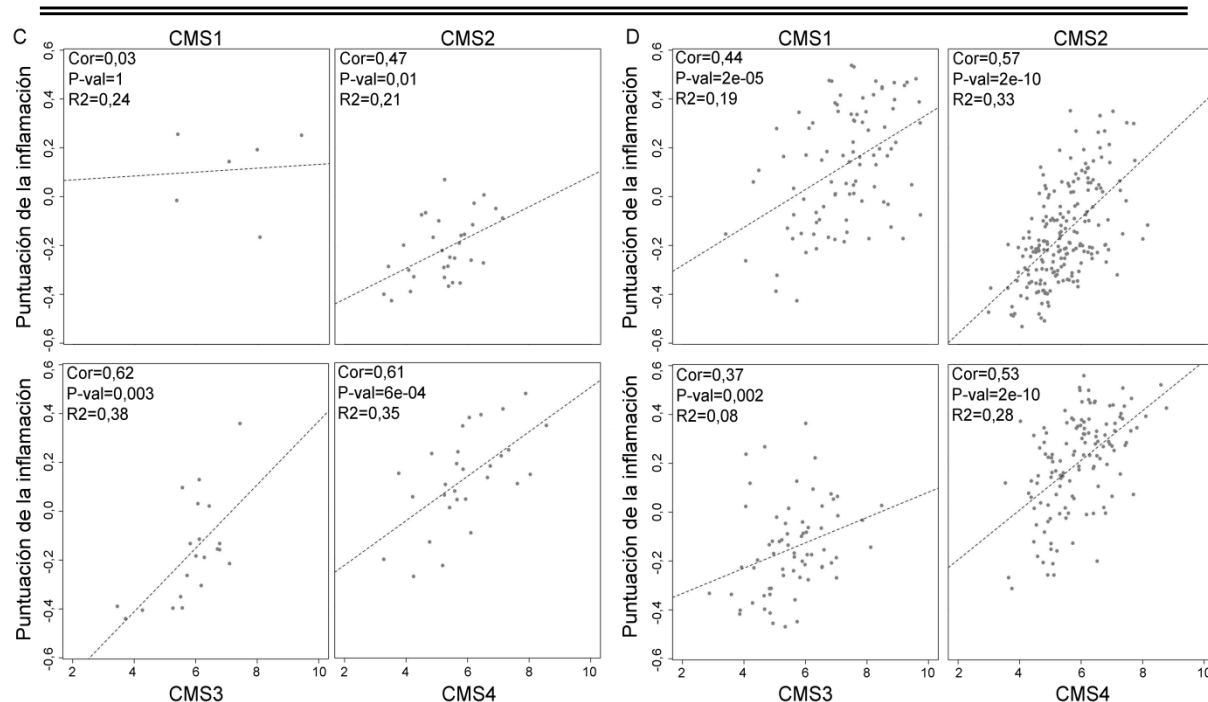


Figura 4.36C-D La expresión de GZMA se correlaciona positivamente con la puntuación de inflamación en muestras humanas independientemente de su subtipo molecular. Los gráficos muestran la correlación entre el nivel de expresión de GZMA (eje x) y la puntuación de inflamación, teniendo en cuenta la clasificación según el CMSs, en las bases de datos de Colonomics (C) y GSE39582 (D). En todas las gráficas, se representan el valor del coeficiente de correlación de Spearman (rho), el valor p de correlación y los coeficientes R2. Las líneas de regresión lineal se representan en discontinuo.

4.2.17 Discusión

La respuesta inmune inflamatoria del huésped es un paso crítico para activar los mecanismos de inmunovigilancia contra el cáncer, responsables de la eliminación de las células transformadas y la prevención de la progresión tumoral. Sin embargo, si no se regula adecuadamente, los mismos mecanismos involucrados en la defensa del huésped pueden promover el desarrollo y la progresión del cáncer, así como la resistencia al tratamiento; El CCR es el mejor ejemplo de estas dos funciones opuestas de la respuesta inmune inflamatoria (387, 651). En la actualidad, el CCR es una de las principales causas de muerte por cáncer, ya que no existe suficiente arsenal terapéutico para tratar la enfermedad de manera segura y efectiva. La mayoría de los pacientes, en los que el cáncer no se puede eliminar de manera eficiente mediante cirugía, mueren.

La GzmA, es una proteína que pertenece a la familia de las serina proteasas, tradicionalmente reconocidas como agentes antitumorales y antiinfecciosos debido a su capacidad para desencadenar la muerte celular en las células diana *in vitro*. Contradiendo a esta aseveración, en este trabajo se ha encontrado que la GzmA no es un factor protector durante el CAC, sino que, por el contrario, se comporta como un factor pro-tumorigénico, desempeñando un papel crítico en la regulación de la inflamación intestinal, tanto crónica como aguda, y en el desarrollo del CCR, hallazgo este que abre nuevas oportunidades terapéuticas para el tratamiento del CCR. El efecto pro-tumoral atribuido a la proteasa parece estar relacionado con la capacidad de la GzmA extracelular para promover la producción de IL-6 en macrófagos por un mecanismo dependiente de NF- κ B y, posteriormente, la activación de STAT3 en células de CCR. De hecho, aunque se ha demostrado que varias moléculas inflamatorias modulan las diferentes etapas de la transformación de células epiteliales y el desarrollo de CCR, nuestros datos, tanto *in vitro* como *in vivo*, indican que la IL-6 inducida por GzmA es clave en la capacidad de la proteasa para promover la activación de señales pro-tumorigénicas como p-STAT3 durante el desarrollo de CCR. La activación de STAT3 induciría la expresión de genes antiapoptóticos, como Bcl-2 o Bcl-xL, además de genes proliferativos como la ciclina D1 o c-Myc, y VEGF, que es un potente factor proangiogénico (396, 399). STAT3 activado también puede inducir una activación prolongada de NF- κ B, aspecto este muy importante en la patogénesis del CAC, ya que estos dos factores de transcripción activan los genes necesarios en cada paso del desarrollo del cáncer (394, 397). Esto último podría explicar, en parte, la razón por la cual el sobrenadante de macrófagos previamente estimulado con GzmA activa, también provocó la activación de NF- κ B en la línea celular de CCR murino MC38, además del hecho de que en dicho sobrenadante de macrófagos, previamente estimulado con GzmA activa, también se detectó producción incrementada de TNF- α , potente activador del factor de transcripción NF- κ B (410).

El análisis de muestras de CCR de pacientes humanos revela una estrecha correlación entre la expresión de GZMA y la puntuación inflamatoria, lo que

refuerza el papel de GzmA en la regulación de la inflamación intestinal durante el CCR.

Es importante destacar que las conclusiones obtenidas al estudiar animales deficientes en GzmA se confirmaron mediante el empleo de un inhibidor extracelular de GzmA (serpinb6b) en ratones wt, negando el argumento de que la protección constatada en ausencia de GzmA está relacionada con la presencia de un fenotipo colónico diferente, con respecto a los ratones wt, que podría conducir a un efecto protector frente a la inflamación inducida por el DSS. Para fortalecer esta conclusión, se demostró que la composición de microbiota, los niveles de citoquinas inflamatorias y la permeabilidad intestinal en estado basal son idénticos en los ratones wt y los ratones GzmA^{-/-}.

La GzmA no es el primer miembro de la familia Gzms estudiado durante el CCR inflamatorio, ya que en estudios anteriores se evaluó el papel de la GzmM en el modelo DSS/AOM, constatándose que, en ausencia de GzmM empeoraba la colitis y el CCR (652). Esta ha sido la primera vez que se ha demostrado que una granzima, en este caso la GzmA, modula la inflamación intestinal y promueve el desarrollo del CCR. Además, es el primer miembro en esta familia cuya inactivación mejora la colitis y el desarrollo de CCR.

El papel de la inflamación ha sido ampliamente estudiado durante el desarrollo del tumor, aunque los mecanismos moleculares involucrados aún no se han esclarecido por completo. El equilibrio entre los efectos beneficiosos y perjudiciales de la inflamación (protección del huésped contra desarrollo/progresión tumoral) no se ha elucidado bien. De hecho, la mayoría de las moléculas identificadas como factores inflamatorios pro-tumorales también están críticamente involucradas en la protección llevada a cabo por el sistema inmune, con la notable excepción de la vía COX-2/PGE2. Por lo tanto, la manipulación eficiente de la inflamación es difícil de lograr durante el tratamiento contra el cáncer sin correr el riesgo de efectos adversos, incluidas infecciones oportunistas graves (576, 653). Otros grupos han demostrado con anterioridad que los ratones GzmA^{-/-} eliminan eficazmente las infecciones virales y bacterianas experimentales, así como los tumores (30, 75, 150). Por lo tanto, la inactivación o bloqueo de la GzmA no debería predisponer a efectos secundarios

importantes, como infección y aparición de cáncer, a diferencia de otros fármacos antiinflamatorios comúnmente utilizados, como bloqueadores de IL-6 o TNF- α (576, 653). Precisamente, en el presente estudio se demostró que el bloqueo de IL-6, en las etapas finales del desarrollo tumoral, empeoraba inflamación, así como el comportamiento de los tumores en los ratones deficientes en GzmA, demostrándose la importancia de la IL-6 en reparación de la mucosa epitelial intestinal y en el control de la inflamación y del desarrollo tumoral, lo que reitera la necesidad de buscar nuevas dianas terapéuticas que permitan tratar el CCR con una relación beneficio/riesgo mayor.

Este estudio es el primero en identificar a la GzmA como un objetivo potencial para tratar el CCR. Se han encontrado previamente altos niveles de linfocitos infiltrantes que expresan GZMA en humanos con UC (154). Recientemente se ha demostrado que, los pacientes que expresan altos niveles de GzmA en células CD4+ integrina- α E+, tuvieron una mejor respuesta a la inmunoterapia antiinflamatoria con un anticuerpo monoclonal contra la subunidad β 7 de integrina (Etrolizumab) (156). A pesar de estos estudios, no se había explorado la contribución de GzmA en la modulación de la inflamación intestinal y el riesgo de desarrollo de CCR. En el presente trabajo encontramos que los linfocitos convencionales T CD8+/CD3+, los linfocitos CD8 $\alpha\alpha$ + y las células ILC1/NK, aumentan en el tejido intestinal de los ratones tratados con DSS/AOM. Sin embargo, en contraste con los estudios mencionados anteriormente, la expresión de GzmA se asoció principalmente con linfocitos T CD8+, células NK y NKT, pero no con células T CD4+. No ha habido estudios previos que investiguen la expresión de GzmA en diferentes subtipos de IELs de pacientes con CCR.

En concordancia con los resultados obtenidos en el modelo murino DSS/AOM, se encontró una clara correlación entre la expresión de GZMA y la inflamación en dos conjuntos de datos independientes que incluyen diferentes características clínicas y moleculares de tumores colorrectales humanos. No se observó tal correlación entre la expresión de GZMB y la inflamación. Aunque esto no implica necesariamente un papel causal de la expresión de GZMA en la inflamación, los resultados combinados en modelos humanos y de ratón

sugieren ampliamente un papel para GzmA en la regulación de la inflamación durante el CCR.

Para comprender el mecanismo pro-tumoral activado por GzmA y, por lo tanto, abordar desde el punto de vista terapéutico a esta enzima, es clave la ubicación de su acción pro-inflamatoria. Específicamente, es imprescindible establecer si la inflamación inducida por GzmA requiere de su acción intracelular mediada por la Perf, o si puede desencadenar sus efectos desde el espacio extracelular. Aquí se ha demostrado que la GzmA activa está presente en el sobrenadante de los cultivos, *ex vivo*, de explantes de tejido de colon, y que la inactivación *in vivo* de la GzmA, por el serpinb6b exógeno, reduce la inflamación y la incidencia de CCR. Además, se esclareció que la GzmA activa extracelular induce la expresión de IL-6 en macrófagos M1, células del sistema inmune implicadas en el CCR en humanos (654) y en ratones tratados con DSS/AOM (649). También que este proceso fue inhibido al inactivar NF- κ B, usando el Celastrol. Apoyando los datos obtenidos en ratones, previamente se encontró que la GzmA activa extracelular induce la generación de IL-6 en macrófagos humanos no activados (133), aunque los mecanismos subyacentes a este proceso son desconocidos. Por lo tanto, todos los datos que se obtuvieron indican que la GzmA ejerce su función proinflamatoria y cancerígena, fundamentalmente, desde el espacio extracelular. Cuando se aplicó el tratamiento DSS/AOM a ratones deficientes en Perf, estos tuvieron un comportamiento similar a los ratones wt, en cuanto a la severidad de la enfermedad y la supervivencia. Sin embargo, mostraron un comportamiento intermedio entre los ratones wt y GzmA^{-/-}, en cuanto a la producción de citoquinas pro-inflamatorias, así como en cuanto al daño macroscópico a nivel de colon, el número de tumores por ratón y la incidencia tumoral, lo que en parte concuerda con lo obtenido en un estudio previo realizado por Waldner et al (646). Este resultado indicaría que no se pueden descartar del todo acciones pro-tumorales intracelulares para la GzmA, lo que no necesariamente contradice nuestros hallazgos. A pesar de la relevancia de la Perf, sus funciones moleculares y celulares, así como las bases de su interacción con las Gzms, siguen siendo poco conocidas (30). Las consecuencias de la deficiencia de Perf

podrían sesgar las poblaciones de células inmunes, como ocurre en la linfohistiocitosis hemofagocítica familiar (FHL), y/o la acción de otras Gzms (33, 655-658).

En resumen, la GzmA contribuye al desarrollo de CCR *in vivo* a través de la regulación de la respuesta inflamatoria intestinal, mediante mecanismos que sostienen la perpetuación de un microambiente inflamatorio, probablemente por su acción sobre los macrófagos intestinales. Este microambiente inflamatorio facilitaría el desarrollo, la progresión y la perpetuación del CCR. Nuestros datos muestran claramente que la ausencia de la proteasa reduce significativamente la gravedad de la enfermedad y disminuye la incidencia de tumores, así como la cantidad y el tamaño de los tumores. Finalmente, hemos demostrado que la inhibición de GzmA extracelular por serpinb6b reduce el daño del colon, los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α , así como el número e incidencia de tumores. Nuestros hallazgos sugieren que el desarrollo de inhibidores efectivos y específicos de GzmA podría tener un efecto beneficioso para el tratamiento de la inflamación intestinal y el desarrollo de CCR de una manera más selectiva y segura que otras terapias comúnmente utilizadas en el tratamiento de estas enfermedades.

CONCLUSIONES

5- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten destacar las siguientes conclusiones:

1. La deficiencia de GzmA atenúa la severidad de la artritis inducida por colágeno *in vivo*, a nivel macroscópico e histológico.
2. La disminución de la severidad de la AR en los ratones deficientes en GzmA se acompaña de una menor producción de citoquinas proinflamatorias, en el suero y en el cultivo *in vitro* de ganglios linfáticos, con relevancia en la patología tales como TNF- α e IL17A.
3. Los niveles de GzmA se incrementan en el suero y articulaciones de ratones wt con CIA. Este comportamiento se corresponde a lo encontrado en humanos con AR.
4. Durante la CIA la generación de la respuesta de células B frente al colágeno, está regulada por la presencia de GzmA. La protección observada durante la deficiencia de GzmA no se debe a la generación de células T menos activas.
5. *In vivo*, la expresión de osteoclastos (OCs) está reducida en ausencia de GzmA durante CIA.
6. *In vitro*, la GzmA induce la formación y maduración de OCs induciendo a los precursores de estas células a expresar y secretar TNF- α . Este proceso no es inhibido por el receptor señuelo de RANKL, la OPG.
7. La expresión de mRNA de GZMA, así como los niveles de GzmA activa, están incrementados en el cultivo de explantes de tejido de colon de ratones wt durante el tratamiento con DSS y DSS/AOM.
8. La ausencia de GzmA disminuye la severidad de la colitis, crónica y aguda, inducida por DSS, así como el daño macroscópico e histológico a nivel intestinal.
9. La ausencia de GzmA aumenta la supervivencia en los ratones durante la etapa aguda de la colitis inducida por DSS.
10. La disminución de la severidad y aumento de la supervivencia en los ratones deficientes en GzmA tratados con DSS se acompaña de una menor producción de citoquinas proinflamatorias, a nivel intestinal, importantes en la fisiopatología de la enfermedad, tales como IL-6 y

- TNF- α . Además, en estos ratones se observó un aumento de la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10.
11. *In vivo*, las células NK/ILC1, las células NKT y las células T CD8⁺ son las principales IELs productoras de GzmA durante el tratamiento con DSS/AOM.
 12. *In vivo*, la ausencia de GzmA disminuye la severidad del CCR de origen inflamatorio, así como el daño macroscópico e histológico a nivel intestinal.
 13. Durante la ausencia de GzmA disminuyen la incidencia de tumores, el número de tumores por ratón y el tamaño de los tumores macroscópicos que se desarrollan. Además, la GzmA desempeña un papel crítico en la transición de un epitelio sano a carcinoma, estando implicada en la EMT y la proliferación celular.
 14. La disminución de la incidencia, número y tamaño de los tumores durante la ausencia de GzmA se acompaña de una menor producción de citoquinas proinflamatorias, a nivel intestinal, importantes en la fisiopatología de la enfermedad, tales como IL-6 y TNF- α , así como una menor actividad de la vía inflamatoria COX-2/PGE2. Además, hubo aumento de la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10.
 15. *In vitro*, la producción de IL-6 inducida por GzmA activa en macrófagos M1, promueve la activación de STAT3 en células de CCR.
 16. *In vivo*, en condiciones basales, la composición de la microbiota, los niveles de citoquinas proinflamatorias y la permeabilidad intestinal son idénticos en los ratones wt y los ratones deficientes en GzmA.
 17. La GzmA ejerce sus acciones proinflamatorias y protumorales fundamentalmente de manera extracelular, pero no se puede descartar las acciones intracelulares de la proteasa.
 18. La inhibición selectiva de GzmA extracelular, con serpinb6b, atenúa la inflamación y el desarrollo de CCR.
 19. Existe correlación significativa entre la expresión de mRNA de GZMA y la puntuación inflamatoria en muestras de CCR de pacientes humanos.

BIBLIOGRAFÍA

6- BIBLIOGRAFÍA

1. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296(5566):301-5.
2. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual review of immunology*. 2015;33:257-90.
3. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. 2014;157(5):1013-22.
4. Karin M. The NF-kappa B activation pathway: its regulation and role in inflammation and cell survival. *The cancer journal from Scientific American*. 1998;4 Suppl 1:S92-9.
5. Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition reviews*. 2007;65(12 Pt 2):S140-6.
6. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2101-14 e5.
7. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology*. 2009;27:519-50.
8. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*. 2014;5:461.
9. Sancho D, Reis e Sousa C. Sensing of cell death by myeloid C-type lectin receptors. *Current opinion in immunology*. 2013;25(1):46-52.
10. de Torre-Minguela C, Mesa Del Castillo P, Pelegrin P. The NLRP3 and Pypin Inflammasomes: Implications in the Pathophysiology of Autoinflammatory Diseases. *Frontiers in immunology*. 2017;8:43.
11. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology*. 2009;27:229-65.
12. Martinez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(22):5047-56.
13. Pardo J, Aguilo JI, Anel A, Martin P, Joeckel L, Borner C, et al. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2009;11(4):452-9.
14. Bossi G, Griffiths GM. CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Seminars in immunology*. 2005;17(1):87-94.
15. de Saint Basile G, Menasche G, Fischer A. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(8):568-79.
16. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 1999;285(5425):221-7.

17. Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity*. 2001;15(5):751-61.
18. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990;346(6283):425-34.
19. Topham NJ, Hewitt EW. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*. 2009;128(1):7-15.
20. Stinchcombe JC, Barral DC, Mules EH, Booth S, Hume AN, Machesky LM, et al. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of cell biology*. 2001;152(4):825-34.
21. Orange JS, Harris KE, Andzelm MM, Valter MM, Geha RS, Strominger JL. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(24):14151-6.
22. Krzewski K, Coligan JE. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Frontiers in immunology*. 2012;3:335.
23. Martin-Cofreces NB, Sancho D, Fernandez E, Vicente-Manzanares M, Gordon-Alonso M, Montoya MC, et al. Role of Fyn in the rearrangement of tubulin cytoskeleton induced through TCR. *Journal of immunology*. 2006;176(7):4201-7.
24. Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Fuller S, Griffiths GM. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature*. 2006;443(7110):462-5.
25. Haddad EK, Wu X, Hammer JA, 3rd, Henkart PA. Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *The Journal of cell biology*. 2001;152(4):835-42.
26. Clark RH, Stinchcombe JC, Day A, Blott E, Booth S, Bossi G, et al. Adaptor protein 3-dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nature immunology*. 2003;4(11):1111-20.
27. Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, Dumont C, et al. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*. 2003;115(4):461-73.
28. Herz J, Pardo J, Kashkar H, Schramm M, Kuzmenkina E, Bos E, et al. Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes. *Nature immunology*. 2009;10(7):761-8.
29. Hwang JY, Ohira T, Hirano I, Aoki T. A pore-forming protein, perforin, from a non-mammalian organism, Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics*. 2004;56(5):360-7.
30. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(10):735-47.
31. Trapani JA, Sutton VR. Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Current opinion in immunology*. 2003;15(5):533-43.

32. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(6):401-9.
33. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*. 1994;369(6475):31-7.
34. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(6):388-400.
35. Lichtenheld MG, Olsen KJ, Lu P, Lowrey DM, Hameed A, Hengartner H, et al. Structure and function of human perforin. *Nature*. 1988;335(6189):448-51.
36. Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smyth MJ, et al. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(9):8426-34.
37. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(12):940-52.
38. Fraser SA, Karimi R, Michalak M, Hudig D. Perforin lytic activity is controlled by calreticulin. *Journal of immunology*. 2000;164(8):4150-5.
39. Praper T, Besenicar MP, Istinic H, Podlesek Z, Metkar SS, Froelich CJ, et al. Human perforin permeabilizing activity, but not binding to lipid membranes, is affected by pH. *Molecular immunology*. 2010;47(15):2492-504.
40. Idone V, Tam C, Goss JW, Toomre D, Pypaert M, Andrews NW. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *The Journal of cell biology*. 2008;180(5):905-14.
41. Duke RC, Persechini PM, Chang S, Liu CC, Cohen JJ, Young JD. Purified perforin induces target cell lysis but not DNA fragmentation. *The Journal of experimental medicine*. 1989;170(4):1451-6.
42. Lopez JA, Brennan AJ, Whisstock JC, Voskoboinik I, Trapani JA. Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. *Trends in immunology*. 2012;33(8):406-12.
43. Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(4):493-503.
44. Baran K, Ciccone A, Peters C, Yagita H, Bird PI, Villadangos JA, et al. Cytotoxic T lymphocytes from cathepsin B-deficient mice survive normally in vitro and in vivo after encountering and killing target cells. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(41):30485-91.
45. Cohnen A, Chiang SC, Stojanovic A, Schmidt H, Claus M, Saftig P, et al. Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood*. 2013;122(8):1411-8.

46. Bird CH, Sutton VR, Sun J, Hirst CE, Novak A, Kumar S, et al. Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(11):6387-98.
47. Law RH, Lukyanova N, Voskoboinik I, Caradoc-Davies TT, Baran K, Dunstone MA, et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature*. 2010;468(7322):447-51.
48. Baran K, Dunstone M, Chia J, Ciccone A, Browne KA, Clarke CJ, et al. The molecular basis for perforin oligomerization and transmembrane pore assembly. *Immunity*. 2009;30(5):684-95.
49. Podack ER, Young JD, Cohn ZA. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(24):8629-33.
50. Metkar SS, Wang B, Catalan E, Anderlueh G, Gilbert RJ, Pardo J, et al. Perforin rapidly induces plasma membrane phospholipid flip-flop. *PloS one*. 2011;6(9):e24286.
51. Metkar SS, Marchioretto M, Antonini V, Lunelli L, Wang B, Gilbert RJ, et al. Perforin oligomers form arcs in cellular membranes: a locus for intracellular delivery of granzymes. *Cell death and differentiation*. 2015;22(1):74-85.
52. Browne KA, Blink E, Sutton VR, Froelich CJ, Jans DA, Trapani JA. Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(12):8604-15.
53. Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibei JA, Caputo A, Hobman M, et al. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell*. 2000;103(3):491-500.
54. Trapani JA, Sutton VR, Thia KY, Li YQ, Froelich CJ, Jans DA, et al. A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *The Journal of cell biology*. 2003;160(2):223-33.
55. Raja SM, Metkar SS, Honing S, Wang B, Russin WA, Pipalia NH, et al. A novel mechanism for protein delivery: granzyme B undergoes electrostatic exchange from serglycin to target cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(21):20752-61.
56. Shi L, Keefe D, Durand E, Feng H, Zhang D, Lieberman J. Granzyme B binds to target cells mostly by charge and must be added at the same time as perforin to trigger apoptosis. *Journal of immunology*. 2005;174(9):5456-61.
57. Keefe D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, Kirchhausen T, et al. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*. 2005;23(3):249-62.

58. Thiery J, Keefe D, Saffarian S, Martinvalet D, Walch M, Boucrot E, et al. Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood*. 2010;115(8):1582-93.
59. Masson D, Tschopp J. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell*. 1987;49(5):679-85.
60. 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 letters*. 1987;223(2):352-60.
61. Bovenschen N, Kummer JA. Orphan granzymes find a home. *Immunological reviews*. 2010;235(1):117-27.
62. Choy JC, McDonald PC, Suarez AC, Hung VH, Wilson JE, McManus BM, et al. Granzyme B in atherosclerosis and transplant vascular disease: association with cell death and atherosclerotic disease severity. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2003;16(5):460-70.
63. 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;104(9):2840-8.
64. Koizumi H, Liu CC, Zheng LM, Joag SV, Bayne NK, Holoshitz J, et al. Expression of perforin and serine esterases by human gamma/delta T cells. *The Journal of experimental medicine*. 1991;173(2):499-502.
65. Pardo J, Wallich R, Ebnet K, Iden S, Zentgraf H, Martin P, et al. Granzyme B is expressed in mouse mast cells in vivo and in vitro and causes delayed cell death independent of perforin. *Cell death and differentiation*. 2007;14(10):1768-79.
66. Tschopp CM, Spiegl N, Didichenko S, Lutmann W, Julius P, Virchow JC, et al. Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. *Blood*. 2006;108(7):2290-9.
67. 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. *Molecular human reproduction*. 2001;7(12):1133-42.
68. Hernandez-Pigeon H, Jean C, Charruyer A, Haure MJ, Titeux M, Tonasso L, et al. Human keratinocytes acquire cellular cytotoxicity under UV-B irradiation. Implication of granzyme B and perforin. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(19):13525-32.
69. Vernooij JH, Moller GM, van Suylen RJ, van Spijk MP, Cloots RH, Hoet PH, et al. Increased granzyme A expression in type II pneumocytes of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;175(5):464-72.

70. Kaiserman D, Bird PI. Control of granzymes by serpins. *Cell death and differentiation*. 2010;17(4):586-95.
71. 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. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(4):2458-67.
72. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annual review of immunology*. 2008;26:389-420.
73. Afonina IS, Cullen SP, Martin SJ. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunological reviews*. 2010;235(1):105-16.
74. Andrade F. Non-cytotoxic antiviral activities of granzymes in the context of the immune antiviral state. *Immunological reviews*. 2010;235(1):128-46.
75. Anthony DA, Andrews DM, Watt SV, Trapani JA, Smyth MJ. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. *Immunological reviews*. 2010;235(1):73-92.
76. Strik MC, de Koning PJ, Kleijmeer MJ, Bladergroen BA, Wolbink AM, Griffith JM, et al. Human mast cells produce and release the cytotoxic lymphocyte associated protease granzyme B upon activation. *Molecular immunology*. 2007;44(14):3462-72.
77. Shen Y, Cheng F, Sharma M, Merkulova Y, Raithatha SA, Parkinson LG, et al. Granzyme B Deficiency Protects against Angiotensin II-Induced Cardiac Fibrosis. *The American journal of pathology*. 2016;186(1):87-100.
78. Hsu I, Parkinson LG, Shen Y, Toro A, Brown T, Zhao H, et al. Serpina3n accelerates tissue repair in a diabetic mouse model of delayed wound healing. *Cell death & disease*. 2014;5:e1458.
79. Hiebert PR, Wu D, Granville DJ. Granzyme B degrades extracellular matrix and contributes to delayed wound closure in apolipoprotein E knockout mice. *Cell death and differentiation*. 2013;20(10):1404-14.
80. Hiebert PR, Granville DJ. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(12):732-41.
81. Prakash MD, Munoz MA, Jain R, Tong PL, Koskinen A, Regner M, et al. Granzyme B promotes cytotoxic lymphocyte transmigration via basement membrane remodeling. *Immunity*. 2014;41(6):960-72.
82. Arias M, Martinez-Lostao L, Santiago L, Ferrandez A, Granville DJ, Pardo J. The Untold Story of Granzymes in Oncoimmunology: Novel Opportunities with Old Acquaintances. *Trends in cancer*. 2017;3(6):407-22.
83. Merkulova Y, Shen Y, Parkinson LG, Raithatha SA, Zhao H, Westendorf K, et al. Granzyme B inhibits keratinocyte migration by disrupting epidermal growth factor receptor (EGFR)-mediated signaling. *Biological chemistry*. 2016;397(9):883-95.

84. Turner CT, Zeglinski MR, Richardson KC, Zhao H, Shen Y, Papp A, et al. Granzyme K Expressed by Classically Activated Macrophages Contributes to Inflammation and Impaired Remodeling. *The Journal of investigative dermatology*. 2019;139(4):930-9.
85. Russo V, Klein T, Lim DJ, Solis N, Machado Y, Hiroyasu S, et al. Granzyme B is elevated in autoimmune blistering diseases and cleaves key anchoring proteins of the dermal-epidermal junction. *Scientific reports*. 2018;8(1):9690.
86. Turner CT, Lim D, Granville DJ. Granzyme B in skin inflammation and disease. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2019;75-76:126-40.
87. Buzza MS, Bird PI. Extracellular granzymes: current perspectives. *Biological chemistry*. 2006;387(7):827-37.
88. Van de Craen M, Van den Brande I, Declercq W, Irmeler M, Beyaert R, Tschopp J, et al. Cleavage of caspase family members by granzyme B: a comparative study in vitro. *European journal of immunology*. 1997;27(5):1296-9.
89. Pardo J, Wallich R, Martin P, Urban C, Rongvaux A, Flavell RA, et al. Granzyme B-induced cell death exerted by ex vivo CTL: discriminating requirements for cell death and some of its signs. *Cell death and differentiation*. 2008;15(3):567-79.
90. Metkar SS, Wang B, Ebbs ML, Kim JH, Lee YJ, Raja SM, et al. Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *The Journal of cell biology*. 2003;160(6):875-85.
91. Alimonti JB, Shi L, Baijal PK, Greenberg AH. Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(10):6974-82.
92. Goping IS, Barry M, Liston P, Sawchuk T, Constantinescu G, Michalak KM, et al. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity*. 2003;18(3):355-65.
93. Heibein JA, Goping IS, Barry M, Pinkoski MJ, Shore GC, Green DR, et al. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(10):1391-402.
94. Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, et al. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(10):1403-14.
95. Casciola-Rosen L, Garcia-Calvo M, Bull HG, Becker JW, Hines T, Thornberry NA, et al. Mouse and human granzyme B have distinct tetrapeptide specificities and abilities to recruit the bid pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(7):4545-52.

96. Cullen SP, Adrain C, Luthi AU, Duriez PJ, Martin SJ. Human and murine granzyme B exhibit divergent substrate preferences. *The Journal of cell biology*. 2007;176(4):435-44.
97. Kaiserman D, Bird CH, Sun J, Matthews A, Ung K, Whisstock JC, et al. The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. *The Journal of cell biology*. 2006;175(4):619-30.
98. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*. 1995;377(6548):446-8.
99. Adrain C, Murphy BM, Martin SJ. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(6):4663-73.
100. Thomas DA, Du C, Xu M, Wang X, Ley TJ. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity*. 2000;12(6):621-32.
101. Catalan E, Jaime-Sanchez P, Aguilo N, Simon MM, Froelich CJ, Pardo J. Mouse cytotoxic T cell-derived granzyme B activates the mitochondrial cell death pathway in a Bim-dependent fashion. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(11):6868-77.
102. Han J, Goldstein LA, Gastman BR, Froelich CJ, Yin XM, Rabinowich H. Degradation of Mcl-1 by granzyme B: implications for Bim-mediated mitochondrial apoptotic events. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(21):22020-9.
103. Goping IS, Sawchuk T, Underhill DA, Bleackley RC. Identification of {alpha}-tubulin as a granzyme B substrate during CTL-mediated apoptosis. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 5):858-65.
104. 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;76(6):977-87.
105. Buzza MS, Dyson JM, Choi H, Gardiner EE, Andrews RK, Kaiserman D, et al. Antihemostatic activity of human granzyme B mediated by cleavage of von Willebrand factor. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(33):22498-504.
106. 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. *Experimental gerontology*. 2011;46(6):489-99.
107. Hendel A, Hsu I, Granville DJ. Granzyme B releases vascular endothelial growth factor from extracellular matrix and induces vascular permeability. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2014;94(7):716-25.
108. Hendel A, Hiebert PR, Boivin WA, Williams SJ, Granville DJ. Granzymes in age-related cardiovascular and pulmonary diseases. *Cell death and differentiation*. 2010;17(4):596-606.

109. 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. *The EMBO journal*. 2007;26(8):2148-57.
110. Knickelbein JE, Khanna KM, Yee MB, Baty CJ, Kinchington PR, Hendricks RL. Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science*. 2008;322(5899):268-71.
111. 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). *Clinical and experimental immunology*. 1999;116(2):366-70.
112. Afonina IS, Tynan GA, Logue SE, Cullen SP, Bots M, Luthi AU, et al. Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1alpha. *Molecular cell*. 2011;44(2):265-78.
113. Haile Y, Carmine-Simmen K, Olechowski C, Kerr B, Bleackley RC, Giuliani F. Granzyme B-inhibitor serpinA3n induces neuroprotection in vitro and in vivo. *Journal of neuroinflammation*. 2015;12:157.
114. Hirota JA, Hiebert PR, Gold M, Wu D, Graydon C, Smith JA, et al. Granzyme B deficiency exacerbates lung inflammation in mice after acute lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2013;49(3):453-62.
115. Garcia-Laorden MI, Stroo I, Blok DC, Florquin S, Medema JP, de Vos AF, et al. Granzymes A and B Regulate the Local Inflammatory Response during *Klebsiella pneumoniae* Pneumonia. *Journal of innate immunity*. 2016;8(3):258-68.
116. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007;27(4):635-46.
117. Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2328-39.
118. Kelley TW, Pohlman B, Elson P, Hsi ED. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. *American journal of clinical pathology*. 2007;128(6):958-65.
119. Polcher M, Braun M, Friedrichs N, Rudlowski C, Bercht E, Fimmers R, et al. Foxp3(+) cell infiltration and granzyme B(+)/Foxp3(+) cell ratio are associated with outcome in neoadjuvant chemotherapy-treated ovarian carcinoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2010;59(6):909-19.
120. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TF, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer research*. 2013;73(8):2468-79.

121. Wieckowski E, Wang GQ, Gastman BR, Goldstein LA, Rabinowich H. Granzyme B-mediated degradation of T-cell receptor zeta chain. *Cancer research*. 2002;62(17):4884-9.
122. Zhang Y, Gallastegui N, Rosenblatt JD. Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *International immunology*. 2015;27(10):521-30.
123. Jahrsdorfer B, Vollmer A, Blackwell SE, Maier J, Sontheimer K, Beyer T, et al. Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion. *Blood*. 2010;115(6):1156-65.
124. Karrich JJ, Jachimowski LC, Nagasawa M, Kamp A, Balzarolo M, Wolkers MC, et al. IL-21-stimulated human plasmacytoid dendritic cells secrete granzyme B, which impairs their capacity to induce T-cell proliferation. *Blood*. 2013;121(16):3103-11.
125. Chen X, Eksioglu EA, Zhou J, Zhang L, Djeu J, Fortenbery N, et al. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(11):4595-611.
126. Dufait I, Pardo J, Escors D, De Vlaeminck Y, Jiang H, Keyaerts M, et al. Perforin and Granzyme B Expressed by Murine Myeloid-Derived Suppressor Cells: A Study on Their Role in Outgrowth of Cancer Cells. *Cancers*. 2019;11(6).
127. Oldford SA, Marshall JS. Mast cells as targets for immunotherapy of solid tumors. *Molecular immunology*. 2015;63(1):113-24.
128. Froelich CJ, Pardo J, Simon MM. Granule-associated serine proteases: granzymes might not just be killer proteases. *Trends in immunology*. 2009;30(3):117-23.
129. Ebnet K, Hausmann M, Lehmann-Grube F, Mullbacher A, Kopf M, Lamers M, et al. Granzyme A-deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity. *The EMBO journal*. 1995;14(17):4230-9.
130. Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, Lieberman J. Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity*. 1999;10(5):585-94.
131. Shi L, Kraut RP, Aebersold R, Greenberg AH. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *The Journal of experimental medicine*. 1992;175(2):553-66.
132. Shi L, Kam CM, Powers JC, Aebersold R, Greenberg AH. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *The Journal of experimental medicine*. 1992;176(6):1521-9.
133. Metkar SS, Menaa C, Pardo J, Wang B, Wallich R, Freudenberg M, et al. Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. *Immunity*. 2008;29(5):720-33.
134. Martinvalet D, Dykxhoorn DM, Ferrini R, Lieberman J. Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell*. 2008;133(4):681-92.

135. Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo ML, et al. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(46):43285-93.
136. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005;22(3):355-70.
137. Fan Z, Beresford PJ, Zhang D, Xu Z, Novina CD, Yoshida A, et al. Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nature immunology*. 2003;4(2):145-53.
138. Fan Z, Beresford PJ, Zhang D, Lieberman J. HMG2 interacts with the nucleosome assembly protein SET and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(8):2810-20.
139. Chowdhury D, Beresford PJ, Zhu P, Zhang D, Sung JS, Demple B, et al. The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Molecular cell*. 2006;23(1):133-42.
140. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*. 2003;112(5):659-72.
141. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(5):361-70.
142. Zhang D, Pasternack MS, Beresford PJ, Wagner L, Greenberg AH, Lieberman J. Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(5):3683-90.
143. Susanto O, Stewart SE, Voskoboinik I, Brasacchio D, Hagn M, Ellis S, et al. Mouse granzyme A induces a novel death with writhing morphology that is mechanistically distinct from granzyme B-induced apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2013;20(9):1183-93.
144. Irmeler M, Hertig S, MacDonald HR, Sadoul R, Becherer JD, Proudfoot A, et al. Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181(5):1917-22.
145. 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. *Cellular immunology*. 1996;171(1):159-63.
146. Spaeny-Dekking EH, Hanna WL, Wolbink AM, Wever PC, Kummer JA, Swaak AJ, et al. Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses in vitro and in vivo. *Journal of immunology*. 1998;160(7):3610-6.
147. Spencer CT, Abate G, Sakala IG, Xia M, Truscott SM, Eickhoff CS, et al. Granzyme A produced by gamma(9)delta(2) T cells induces human

macrophages to inhibit growth of an intracellular pathogen. *PLoS pathogens*. 2013;9(1):e1003119.

148. Lauw FN, Simpson AJ, Hack CE, Prins JM, Wolbink AM, van Deventer SJ, et al. Soluble granzymes are released during human endotoxemia and in patients with severe infection due to gram-negative bacteria. *The Journal of infectious diseases*. 2000;182(1):206-13.

149. Anthony DA, Andrews DM, Chow M, Watt SV, House C, Akira S, et al. A role for granzyme M in TLR4-driven inflammation and endotoxemia. *Journal of immunology*. 2010;185(3):1794-803.

150. Arias Maykel A, Jiménez de Bagües María P, Aguiló N, Menao S, Hervás-Stubbs S, de Martino A, et al. Elucidating Sources and Roles of Granzymes A and B during Bacterial Infection and Sepsis. *Cell Reports*. 2014.

151. Hermesen CC, Konijnenberg Y, Mulder L, Loe C, van Deuren M, van der Meer JW, et al. Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental *Plasmodium falciparum* infections. *Clinical and experimental immunology*. 2003;132(3):467-72.

152. Wensink AC, Hack CE, Bovenschen N. Granzymes regulate proinflammatory cytokine responses. *Journal of immunology*. 2015;194(2):491-7.

153. Pereira RA, Simon MM, Simmons A. Granzyme A, a noncytolytic component of CD8(+) cell granules, restricts the spread of herpes simplex virus in the peripheral nervous systems of experimentally infected mice. *Journal of virology*. 2000;74(2):1029-32.

154. Muller S, Lory J, Corazza N, Griffiths GM, Z'Graggen K, Mazzucchelli L, et al. Activated CD4+ and CD8+ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *The American journal of pathology*. 1998;152(1):261-8.

155. Mueller JD, Haegle N, Keller G, Mueller E, Saretzky G, Bethke B, et al. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in de novo versus ex-adenoma carcinomas of the colorectum. *The American journal of pathology*. 1998;153(6):1977-84.

156. Tew GW, Hackney JA, Gibbons D, Lamb CA, Luca D, Egen JG, et al. Association Between Response to Etrolizumab and Expression of Integrin alphaE and Granzyme A in Colon Biopsies of Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2016;150(2):477-87 e9.

157. Simon MM, Simon HG, Fruth U, Epplen J, Muller-Hermelink HK, Kramer MD. Cloned cytolytic T-effector cells and their malignant variants produce an extracellular matrix degrading trypsin-like serine proteinase. *Immunology*. 1987;60(2):219-30.

158. 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;73(1):117-9.

159. Simon MM, Prester M, Nerz G, Kramer MD, Fruth U. Release of biologically active fragments from human plasma-fibronectin by murine T cell-specific proteinase 1 (TSP-1). *Biological chemistry Hoppe-Seyler*. 1988;369 Suppl:107-12.
160. Yoshikawa Y, Hirayasu H, Tsuzuki S, Fushiki T. Granzyme A causes detachment of alveolar epithelial A549 cells accompanied by promotion of interleukin-8 release. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2008;72(9):2481-4.
161. Grossman WJ, Revell PA, Lu ZH, Johnson H, Bredemeyer AJ, Ley TJ. The orphan granzymes of humans and mice. *Current opinion in immunology*. 2003;15(5):544-52.
162. Zhao T, Zhang H, Guo Y, Fan Z. Granzyme K directly processes bid to release cytochrome c and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(16):12104-11.
163. Zhao T, Zhang H, Guo Y, Zhang Q, Hua G, Lu H, et al. Granzyme K cleaves the nucleosome assembly protein SET to induce single-stranded DNA nicks of target cells. *Cell death and differentiation*. 2007;14(3):489-99.
164. Guo Y, Chen J, Zhao T, Fan Z. Granzyme K degrades the redox/DNA repair enzyme Ape1 to trigger oxidative stress of target cells leading to cytotoxicity. *Molecular immunology*. 2008;45(8):2225-35.
165. Joeckel LT, Wallich R, Martin P, Sanchez-Martinez D, Weber FC, Martin SF, et al. Mouse granzyme K has pro-inflammatory potential. *Cell death and differentiation*. 2011;18(7):1112-9.
166. Cooper DM, Pechkovsky DV, Hackett TL, Knight DA, Granville DJ. Granzyme K activates protease-activated receptor-1. *PloS one*. 2011;6(6):e21484.
167. Rucevic M, Fast LD, Jay GD, Trespalcios FM, Sucov A, Siryaporn E, et al. Altered levels and molecular forms of granzyme k in plasma from septic patients. *Shock*. 2007;27(5):488-93.
168. Kelly JM, Waterhouse NJ, Cretney E, Browne KA, Ellis S, Trapani JA, et al. Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(21):22236-42.
169. Bovenschen N, de Koning PJ, Quadir R, Broekhuizen R, Damen JM, Froelich CJ, et al. NK cell protease granzyme M targets alpha-tubulin and disorganizes the microtubule network. *Journal of immunology*. 2008;180(12):8184-91.
170. Mahrus S, Kisiel W, Craik CS. Granzyme M is a regulatory protease that inactivates proteinase inhibitor 9, an endogenous inhibitor of granzyme B. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(52):54275-82.
171. Pao LI, Sumaria N, Kelly JM, van Dommelen S, Cretney E, Wallace ME, et al. Functional analysis of granzyme M and its role in immunity to infection. *Journal of immunology*. 2005;175(5):3235-43.

172. Baschuk N, Wang N, Watt SV, Halse H, House C, Bird PI, et al. NK cell intrinsic regulation of MIP-1alpha by granzyme M. *Cell death & disease*. 2014;5:e11115.
173. Fellows E, Gil-Parrado S, Jenne DE, Kurschus FC. Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program. *Blood*. 2007;110(2):544-52.
174. Romero V, Andrade F. Non-apoptotic functions of granzymes. *Tissue antigens*. 2008;71(5):409-16.
175. Johnson H, Scorrano L, Korsmeyer SJ, Ley TJ. Cell death induced by granzyme C. *Blood*. 2003;101(8):3093-101.
176. Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical reviews*. 2002;102(12):4751-804.
177. de Koning PJ, Kummer JA, de Poot SA, Quadir R, Broekhuizen R, McGettrick AF, et al. Intracellular serine protease inhibitor SERPINB4 inhibits granzyme M-induced cell death. *PloS one*. 2011;6(8):e22645.
178. Wang L, Li Q, Wu L, Liu S, Zhang Y, Yang X, et al. Identification of SERPINB1 as a physiological inhibitor of human granzyme H. *Journal of immunology*. 2013;190(3):1319-30.
179. Tremblay GM, Wolbink AM, Cormier Y, Hack CE. Granzyme activity in the inflamed lung is not controlled by endogenous serine proteinase inhibitors. *Journal of immunology*. 2000;165(7):3966-9.
180. Kurschus FC, Kleinschmidt M, Fellows E, Dornmair K, Rudolph R, Lilie H, et al. Killing of target cells by redirected granzyme B in the absence of perforin. *FEBS letters*. 2004;562(1-3):87-92.
181. Poe M, Blake JT, Boulton DA, Gammon M, Sigal NH, Wu JK, et al. Human cytotoxic lymphocyte granzyme B. Its purification from granules and the characterization of substrate and inhibitor specificity. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(1):98-103.
182. Rowshani AT, Strik MC, Molenaar R, Yong SL, Wolbink AM, Bemelman FJ, et al. The granzyme B inhibitor SERPINB9 (protease inhibitor 9) circulates in blood and increases on primary cytomegalovirus infection after renal transplantation. *The Journal of infectious diseases*. 2005;192(11):1908-11.
183. Sun J, Bird CH, Sutton V, McDonald L, Coughlin PB, De Jong TA, et al. A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(44):27802-9.
184. Bird CH, Blink EJ, Hirst CE, Buzza MS, Steele PM, Sun J, et al. Nucleocytoplasmic distribution of the ovalbumin serpin PI-9 requires a nonconventional nuclear import pathway and the export factor Crm1. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(16):5396-407.
185. Ang LS, Boivin WA, Williams SJ, Zhao H, Abraham T, Carmine-Simmen K, et al. Serpina3n attenuates granzyme B-mediated decorin cleavage and

- rupture in a murine model of aortic aneurysm. *Cell death & disease*. 2011;2:e209.
186. Masson D, Tschopp J. Inhibition of lymphocyte protease granzyme A by antithrombin III. *Molecular immunology*. 1988;25(12):1283-9.
 187. Tsuzuki S, Kokado Y, Satomi S, Yamasaki Y, Hirayasu H, Iwanaga T, et al. Purification and identification of a binding protein for pancreatic secretory trypsin inhibitor: a novel role of the inhibitor as an anti-granzyme A. *The Biochemical journal*. 2003;372(Pt 1):227-33.
 188. Gurwitz D, Simon MM, Fruth U, Cunningham DD. Protease nexin-1 complexes and inhibits T cell serine proteinase-1. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;161(1):300-4.
 189. Simon MM, Kramer MD. Granzyme A. *Methods in enzymology*. 1994;244:68-79.
 190. Suidan HS, Bouvier J, Schaerer E, Stone SR, Monard D, Tschopp J. Granzyme A released upon stimulation of cytotoxic T lymphocytes activates the thrombin receptor on neuronal cells and astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(17):8112-6.
 191. Kaiserman D, Stewart SE, Plasman K, Gevaert K, Van Damme P, Bird PI. Identification of Serpinb6b as a species-specific mouse granzyme A inhibitor suggests functional divergence between human and mouse granzyme A. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(13):9408-17.
 192. Sun J, Ooms L, Bird CH, Sutton VR, Trapani JA, Bird PI. A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the granzyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9). *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(24):15434-41.
 193. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*. 2011;365(23):2205-19.
 194. Chauhan KJ, JS; Al-Dhahir, MA. Rheumatoid Arthritis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441999/>. 2019.
 195. Klodzinski L, Wislowska M. Comorbidities in rheumatic arthritis. *Reumatologia*. 2018;56(4):228-33.
 196. Bansback N, Marra CA, Finckh A, Anis A. The economics of treatment in early rheumatoid arthritis. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2009;23(1):83-92.
 197. Eberhardt K, Larsson BM, Nived K, Lindqvist E. Work disability in rheumatoid arthritis--development over 15 years and evaluation of predictive factors over time. *The Journal of rheumatology*. 2007;34(3):481-7.
 198. Agarwal SK. Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. *Journal of managed care pharmacy : JMCP*. 2011;17(9 Suppl B):S14-8.
 199. Safiri S, Kolahi AA, Hoy D, Smith E, Bettampadi D, Mansournia MA, et al. Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990-2017: a

- systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017. *Annals of the rheumatic diseases*. 2019;78(11):1463-71.
200. Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. Arthritis and rheumatism. 2008;58(1):15-25.
201. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Therneau TM, Gabriel SE. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(6):1576-82.
202. Paula Andrade¹ JAS, Maria Luz Rentero, Volker Hammen and Tatiana Dilla. The Burden of Rheumatoid Arthritis in Spain. *Health Economics & Outcome Research: Open Access*. 2017;Volume 3(1).
203. Taneja V. Arthritis susceptibility and the gut microbiome. *FEBS letters*. 2014;588(22):4244-9.
204. Scher JU, Abramson SB. The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2011;7(10):569-78.
205. Matvey DL, Thomson W, Ollier WE, Batley M, Davies PG, Gough AK, et al. Association of DRB1 shared epitope genotypes with early mortality in rheumatoid arthritis: results of eighteen years of followup from the early rheumatoid arthritis study. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(5):1408-16.
206. Meng W, Zhu Z, Jiang X, Too CL, Uebe S, Jagodic M, et al. DNA methylation mediates genotype and smoking interaction in the development of anti-citrullinated peptide antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2017;19(1):71.
207. Rodriguez-Mahou M, Lopez-Longo FJ, Sanchez-Ramon S, Estechea A, Garcia-Segovia A, Rodriguez-Molina JJ, et al. Association of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-Sa/citrullinated vimentin autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2006;55(4):657-61.
208. Firestein GS. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases*. 2005;11(3 Suppl):S39-44.
209. Nandakumar KS, Holmdahl R. Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(6):223.
210. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1988;31(3):315-24.
211. Tan EM, Smolen JS. Historical observations contributing insights on etiopathogenesis of rheumatoid arthritis and role of rheumatoid factor. *The Journal of experimental medicine*. 2016;213(10):1937-50.
212. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede

the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(2):380-6.

213. Tseng WY, Jan Wu YJ, Yang TY, Chiang NY, Tsai WP, Gordon S, et al. High levels of soluble GPR56/ADGRG1 are associated with positive rheumatoid factor and elevated tumor necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2018;51(4):485-91.

214. de Pablo P, Chapple IL, Buckley CD, Dietrich T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nature reviews Rheumatology*. 2009;5(4):218-24.

215. Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Carreira-Garcia V, Blanco FJ. [Gene polymorphisms and pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis]. *Reumatologia clinica*. 2009;5(6):268-79.

216. Holers VM. Autoimmunity to citrullinated proteins and the initiation of rheumatoid arthritis. *Current opinion in immunology*. 2013;25(6):728-35.

217. Muller S, Radic M. Citrullinated Autoantigens: From Diagnostic Markers to Pathogenetic Mechanisms. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2015;49(2):232-9.

218. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(10):1488-92.

219. Dissick A, Redman RS, Jones M, Rangan BV, Reimold A, Griffiths GR, et al. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *Journal of periodontology*. 2010;81(2):223-30.

220. Zeng X, Ai M, Tian X, Gan X, Shi Y, Song Q, et al. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated Peptide antibody in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2003;30(7):1451-5.

221. Shi J, van Steenberg HW, van Nies JA, Levarht EW, Huizinga TW, van der Helm-van Mil AH, et al. The specificity of anti-carbamylated protein antibodies for rheumatoid arthritis in a setting of early arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2015;17:339.

222. Derksen V, Huizinga TWJ, van der Woude D. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Seminars in immunopathology*. 2017;39(4):437-46.

223. Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis research & therapy*. 2004;6(2):R142-50.

224. Wang X, Chen P, Cui J, Yang C, Du H. Keratin 8 is a novel autoantigen of rheumatoid arthritis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;465(4):665-9.

225. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *The American journal of managed care*. 2012;18(13 Suppl):S295-302.

226. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*. 2017;46(2):183-96.
227. Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Firestein GS. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *The Journal of clinical investigation*. 1990;86(6):1790-8.
228. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nature reviews Rheumatology*. 2013;9(1):24-33.
229. Konttinen YT, Ceponis A, Takagi M, Ainola M, Sorsa T, Sutinen M, et al. New collagenolytic enzymes/cascade identified at the pannus-hard tissue junction in rheumatoid arthritis: destruction from above. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 1998;17(8-9):585-601.
230. Honorati MC, Neri S, Cattini L, Facchini A. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and cartilage*. 2006;14(4):345-52.
231. Komatsu N, Takayanagi H. Inflammation and bone destruction in arthritis: synergistic activity of immune and mesenchymal cells in joints. *Frontiers in immunology*. 2012;3:77.
232. Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, Montecucco C, Manzo A. B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers. *BioMed research international*. 2014;2014:681678.
233. Giltiay NV, Chappell CP, Clark EA. B-cell selection and the development of autoantibodies. *Arthritis research & therapy*. 2012;14 Suppl 4:S1.
234. Samuels J, Ng YS, Coupillaud C, Paget D, Meffre E. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(10):1659-67.
235. Meffre E. The establishment of early B cell tolerance in humans: lessons from primary immunodeficiency diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1246:1-10.
236. Rapetti L, Chavele KM, Evans CM, Ehrenstein MR. B cell resistance to Fas-mediated apoptosis contributes to their ineffective control by regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015;74(1):294-302.
237. Aarvak T, Natvig JB. Cell-cell interactions in synovitis: antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis. *Arthritis research*. 2001;3(1):13-7.
238. Schlegel PM, Steiert I, Kotter I, Muller CA. B cells contribute to heterogeneity of IL-17 producing cells in rheumatoid arthritis and healthy controls. *PloS one*. 2013;8(12):e82580.

239. Cope AP, Schulze-Koops H, Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2007;25(5 Suppl 46):S4-11.
240. Yeo L, Toellner KM, Salmon M, Filer A, Buckley CD, Raza K, et al. Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(11):2022-8.
241. Duke O, Panayi GS, Janossy G, Poulter LW. An immunohistological analysis of lymphocyte subpopulations and their microenvironment in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis using monoclonal antibodies. *Clinical and experimental immunology*. 1982;49(1):22-30.
242. Meednu N, Zhang H, Owen T, Sun W, Wang V, Cistrone C, et al. Production of RANKL by Memory B Cells: A Link Between B Cells and Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & rheumatology*. 2016;68(4):805-16.
243. Podojil JR, Miller SD. Molecular mechanisms of T-cell receptor and costimulatory molecule ligation/blockade in autoimmune disease therapy. *Immunological reviews*. 2009;229(1):337-55.
244. Cope AP. T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2008;10 Suppl 1:S1.
245. Schulze-Koops H, Kalden JR. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2001;15(5):677-91.
246. Alunno A, Manetti M, Caterbi S, Ibba-Manneschi L, Bistoni O, Bartoloni E, et al. Altered immunoregulation in rheumatoid arthritis: the role of regulatory T cells and proinflammatory Th17 cells and therapeutic implications. *Mediators of inflammation*. 2015;2015:751793.
247. Cho ML, Yoon CH, Hwang SY, Park MK, Min SY, Lee SH, et al. Effector function of type II collagen-stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: cross-talk between T cells and synovial fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(3):776-84.
248. Rezzonico R, Burger D, Dayer JM. Direct contact between T lymphocytes and human dermal fibroblasts or synoviocytes down-regulates types I and III collagen production via cell-associated cytokines. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(30):18720-8.
249. Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan AQ, Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016;455:161-71.
250. Li N, Wang JC, Liang TH, Zhu MH, Wang JY, Fu XL, et al. Pathologic finding of increased expression of interleukin-17 in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013;6(7):1375-9.
251. Metawi SA, Abbas D, Kamal MM, Ibrahim MK. Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA. *Clinical rheumatology*. 2011;30(9):1201-7.

252. Benedetti G, Miossec P. Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. *European journal of immunology*. 2014;44(2):339-47.
253. Gaffen SL. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Current rheumatology reports*. 2009;11(5):365-70.
254. Suurmond J, Dorjee AL, Boon MR, Knol EF, Huizinga TW, Toes RE, et al. Mast cells are the main interleukin 17-positive cells in anticitrullinated protein antibody-positive and -negative rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(5):R150.
255. Cooles FA, Isaacs JD, Anderson AE. Treg cells in rheumatoid arthritis: an update. *Current rheumatology reports*. 2013;15(9):352.
256. Boissier MC, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2009;76(1):10-4.
257. Morita T, Shima Y, Wing JB, Sakaguchi S, Ogata A, Kumanogoh A. The Proportion of Regulatory T Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *PloS one*. 2016;11(9):e0162306.
258. Rao DA. T Cells That Help B Cells in Chronically Inflamed Tissues. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1924.
259. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature*. 2017;542(7639):110-4.
260. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(7):1241-53.
261. Kinne RW, Brauer R, Stuhlmuller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis research*. 2000;2(3):189-202.
262. Bresnihan B. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 1999;26(3):717-9.
263. Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(1):115-24.
264. Hahn G, Stuhlmuller B, Hain N, Kalden JR, Pfizenmaier K, Burmester GR. Modulation of monocyte activation in patients with rheumatoid arthritis by leukapheresis therapy. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(3):862-70.
265. Yanni G, Nabil M, Farahat MR, Poston RN, Panayi GS. Intramuscular gold decreases cytokine expression and macrophage numbers in the rheumatoid synovial membrane. *Annals of the rheumatic diseases*. 1994;53(5):315-22.
266. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis and rheumatism*. 1998;41(12):2196-204.

267. Bondeson J, Browne KA, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M. Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of IkappaBalpha into human macrophages: lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor-kappaB independent. *Journal of immunology*. 1999;162(5):2939-45.
268. Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(6):R187.
269. Mateen S, Moin S, Zafar A, Khan AQ. Redox signaling in rheumatoid arthritis and the preventive role of polyphenols. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016;463:4-10.
270. Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;253(2):395-400.
271. Bromley M, Woolley DE. Chondroclasts and osteoclasts at subchondral sites of erosion in the rheumatoid joint. *Arthritis and rheumatism*. 1984;27(9):968-75.
272. Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11(3):234-50.
273. McGonagle D, Tan AL, Moller Dohn U, Ostergaard M, Benjamin M. Microanatomic studies to define predictive factors for the topography of periarticular erosion formation in inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(4):1042-51.
274. Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *The American journal of pathology*. 1998;152(4):943-51.
275. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature medicine*. 2011;17(10):1231-4.
276. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nature medicine*. 2011;17(10):1235-41.
277. Schett G, Teitelbaum SL. Osteoclasts and arthritis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2009;24(7):1142-6.
278. Schett G, Stach C, Zwerina J, Voll R, Manger B. How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(10):2936-48.

279. Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F, et al. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(5):589-95.
280. Alam J, Jantan I, Bukhari SNA. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;92:615-33.
281. Hess A, Axmann R, Rech J, Finzel S, Heindl C, Kreitz S, et al. Blockade of TNF-alpha rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(9):3731-6.
282. Yap HY, Tee SZ, Wong MM, Chow SK, Peh SC, Teow SY. Pathogenic Role of Immune Cells in Rheumatoid Arthritis: Implications in Clinical Treatment and Biomarker Development. *Cells*. 2018;7(10).
283. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(12):2673-82.
284. Kwok SK, Cho ML, Park MK, Oh HJ, Park JS, Her YM, et al. Interleukin-21 promotes osteoclastogenesis in humans with rheumatoid arthritis and in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(3):740-51.
285. Kim KW, Kim HR, Park JY, Park JS, Oh HJ, Woo YJ, et al. Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(4):1015-23.
286. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England journal of medicine*. 2009;361(9):888-98.
287. Kim HR, Cho ML, Kim KW, Juhn JY, Hwang SY, Yoon CH, et al. Up-regulation of IL-23p19 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by IL-17 through PI3-kinase-, NF-kappaB- and p38 MAPK-dependent signalling pathways. *Rheumatology*. 2007;46(1):57-64.
288. Rasmussen TK, Andersen T, Hvid M, Hetland ML, Horslev-Petersen K, Stengaard-Pedersen K, et al. Increased interleukin 21 (IL-21) and IL-23 are associated with increased disease activity and with radiographic status in patients with early rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2010;37(10):2014-20.
289. Di Paola R, Cuzzocrea S. Predictivity and sensitivity of animal models of arthritis. *Autoimmunity reviews*. 2008;8(1):73-5.
290. Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2018;40(3):193-200.

291. Wooley PH, Seibold JR, Whalen JD, Chapdelaine JM. Pristane-induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease. *Arthritis and rheumatism*. 1989;32(8):1022-30.
292. Verheijden GF, Rijnders AW, Bos E, Coenen-de Roo CJ, van Staveren CJ, Miltenburg AM, et al. Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1997;40(6):1115-25.
293. Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*. 1980;283(5748):666-8.
294. Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis and rheumatism*. 1987;30(2):201-12.
295. Zhang Y, Guerassimov A, Leroux JY, Cartman A, Webber C, Lalic R, et al. Induction of arthritis in BALB/c mice by cartilage link protein: involvement of distinct regions recognized by T and B lymphocytes. *The American journal of pathology*. 1998;153(4):1283-91.
296. Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology*. 2005;12(3):167-81.
297. Haqqi TM, Anthony DD, Gupta S, Ahmad N, Lee MS, Kumar GK, et al. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(8):4524-9.
298. Bankhurst AD, Husby G, Williams RC, Jr. Predominance of T cells in the lymphocytic infiltrates of synovial tissues in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1976;19(3):555-62.
299. Moudgil KD, Kim P, Brahn E. Advances in rheumatoid arthritis animal models. *Current rheumatology reports*. 2011;13(5):456-63.
300. McNamee K, Williams R, Seed M. Animal models of rheumatoid arthritis: How informative are they? *European journal of pharmacology*. 2015;759:278-86.
301. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *European journal of immunology*. 2009;39(8):2040-4.
302. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *The Journal of experimental medicine*. 1977;146(3):857-68.
303. Cathcart ES, Hayes KC, Gonnerman WA, Lazzari AA, Franzblau C. Experimental arthritis in a nonhuman primate. I. Induction by bovine type II collagen. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1986;54(1):26-31.
304. Wooley PH, Luthra HS, Stuart JM, David CS. Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and

- antibody correlates. *The Journal of experimental medicine*. 1981;154(3):688-700.
305. Wooley PH, Luthra HS, Griffiths MM, Stuart JM, Huse A, David CS. Type II collagen-induced arthritis in mice. IV. Variations in immunogenetic regulation provide evidence for multiple arthritogenic epitopes on the collagen molecule. *Journal of immunology*. 1985;135(4):2443-51.
306. Williams RO. Collagen-induced arthritis in mice. *Methods in molecular medicine*. 2007;136:191-9.
307. Fugger L, Rothbard JB, Sonderstrup-McDevitt G. Specificity of an HLA-DRB1*0401-restricted T cell response to type II collagen. *European journal of immunology*. 1996;26(4):928-33.
308. Rosloniec EF, Brand DD, Myers LK, Whittington KB, Gumanovskaya M, Zaller DM, et al. An HLA-DR1 transgene confers susceptibility to collagen-induced arthritis elicited with human type II collagen. *The Journal of experimental medicine*. 1997;185(6):1113-22.
309. Campbell IK, Hamilton JA, Wicks IP. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *European journal of immunology*. 2000;30(6):1568-75.
310. Inglis JJ, Criado G, Medghalchi M, Andrews M, Sandison A, Feldmann M, et al. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen. *Arthritis research & therapy*. 2007;9(5):R113.
311. Holmdahl R, Klareskog L, Rubin K, Larsson E, Wigzell H. T lymphocytes in collagen II-induced arthritis in mice. Characterization of arthritogenic collagen II-specific T-cell lines and clones. *Scandinavian journal of immunology*. 1985;22(3):295-306.
312. Ehinger M, Vestberg M, Johansson AC, Johannesson M, Svensson A, Holmdahl R. Influence of CD4 or CD8 deficiency on collagen-induced arthritis. *Immunology*. 2001;103(3):291-300.
313. Kidd BA, Ho PP, Sharpe O, Zhao X, Tomooka BH, Kanter JL, et al. Epitope spreading to citrullinated antigens in mouse models of autoimmune arthritis and demyelination. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(5):R119.
314. Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M, Huang S, Billiau A, Matthys P. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Journal of immunology*. 1997;158(11):5507-13.
315. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(12):1951-7.
316. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology*. 2010;28:445-89.
317. Peck A, Mellins ED. Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clinical immunology*. 2009;132(3):295-304.

318. Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(2):650-9.
319. Kelchtermans H, Schurgers E, Geboes L, Mitera T, Van Damme J, Van Snick J, et al. Effector mechanisms of interleukin-17 in collagen-induced arthritis in the absence of interferon-gamma and counteraction by interferon-gamma. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(4):R122.
320. Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H, Schurgers E, Mitera T, Renauld JC, et al. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(2):390-5.
321. Watson WC, Townes AS. Genetic susceptibility to murine collagen II autoimmune arthritis. Proposed relationship to the IgG2 autoantibody subclass response, complement C5, major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC loci. *The Journal of experimental medicine*. 1985;162(6):1878-91.
322. Kai H, Shibuya K, Wang Y, Kameta H, Kameyama T, Tahara-Hanaoka S, et al. Critical role of M. tuberculosis for dendritic cell maturation to induce collagen-induced arthritis in H-2b background of C57BL/6 mice. *Immunology*. 2006;118(2):233-9.
323. Luross JA, Williams NA. The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis. *Immunology*. 2001;103(4):407-16.
324. Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R, Jansson L. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clinical and experimental immunology*. 1998;111(3):521-6.
325. Nandakumar KS, Andren M, Martinsson P, Bajtner E, Hellstrom S, Holmdahl R, et al. Induction of arthritis by single monoclonal IgG anti-collagen type II antibodies and enhancement of arthritis in mice lacking inhibitory FcγRIIB. *European journal of immunology*. 2003;33(8):2269-77.
326. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
327. Cancer IAfRo. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018 2018. Available from: <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>.
328. Gandomani HY, S Aghajani, M Mohammadian-Hafshejani, A Tarazoj, A Pouyesh, V Salehiniya, H. Colorectal cancer in the world: incidence, mortality and risk factors. *Biomedical Research and Therapy*. 2017;Vol. 4(10):1656-75.
329. SEOM. Las Cifras del Cáncer en España 2018 2018. Available from: https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_Cifras_del_cancer_en_Espana2018.pdf.

330. Sobin LH, Compton CC. TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer*. 2010;116(22):5336-9.
331. Marisa L, de Reynies A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS medicine*. 2013;10(5):e1001453.
332. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homiczko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wulschleger S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nature medicine*. 2013;19(5):619-25.
333. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature medicine*. 2015;21(11):1350-6.
334. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *The Clinical biochemist Reviews*. 2010;31(2):31-8.
335. Hisamuddin IM, Yang VW. Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview. *Current colorectal cancer reports*. 2006;2(2):53-9.
336. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 1994;331(25):1669-74.
337. Papadopoulos N, Lindblom A. Molecular basis of HNPCC: mutations of MMR genes. *Human mutation*. 1997;10(2):89-99.
338. Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, et al. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nature genetics*. 1997;17(1):79-83.
339. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology*. 2003;124(2):544-60.
340. O'Keefe SJ. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2016;13(12):691-706.
341. Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PloS one*. 2011;6(6):e20456.
342. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi FE, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology*. 2015;16(16):1599-600.
343. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1244-60 e16.
344. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, et al. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(7):525-33.

345. Negri E, Franceschi S, Parpinel M, La Vecchia C. Fiber intake and risk of colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 1998;7(8):667-71.
346. Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT, et al. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet*. 2012;380(9838):219-29.
347. Gribovskaja-Rupp I, Kosinski L, Ludwig KA. Obesity and colorectal cancer. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2011;24(4):229-43.
348. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2019;16(12):713-32.
349. Pedersen A, Johansen C, Gronbaek M. Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut*. 2003;52(6):861-7.
350. Sostres C, Gargallo CJ, Lanas A. Aspirin, cyclooxygenase inhibition and colorectal cancer. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*. 2014;5(1):40-9.
351. Sostres C, Lanas A. Gastrointestinal effects of aspirin. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2011;8(7):385-94.
352. Joharatnam-Hogan N, Cafferty F, Hubner R, Swinson D, Sothi S, Gupta K, et al. Aspirin as an adjuvant treatment for cancer: feasibility results from the Add-Aspirin randomised trial. *The lancet Gastroenterology & hepatology*. 2019;4(11):854-62.
353. Cea Soriano L, Lanas A, Soriano-Gabarro M, Garcia Rodriguez LA. Incidence of Upper and Lower Gastrointestinal Bleeding in New Users of Low-Dose Aspirin. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2019;17(5):887-95 e6.
354. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet*. 2010;376(9754):1741-50.
355. Hildebrand JS, Jacobs EJ, Campbell PT, McCullough ML, Teras LR, Thun MJ, et al. Colorectal cancer incidence and postmenopausal hormone use by type, recency, and duration in cancer prevention study II. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(11):2835-41.
356. Thosani N, Thosani SN, Kumar S, Nugent Z, Jimenez C, Singh H, et al. Reduced risk of colorectal cancer with use of oral bisphosphonates: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(5):623-30.

357. Makar GA, Holmes JH, Yang YX. Angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy and colorectal cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(2):dj374.
358. Lutgens MW, van Oijen MG, van der Heijden GJ, Vleggaar FP, Siersema PD, Oldenburg B. Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(4):789-99.
359. Jess T, Frisch M, Simonsen J. Trends in overall and cause-specific mortality among patients with inflammatory bowel disease from 1982 to 2010. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013;11(1):43-8.
360. Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, Hossain S, Matula S, Kornbluth A, et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology*. 2007;133(4):1099-105; quiz 340-1.
361. Rubin DT, Huo D, Kinnucan JA, Sedrak MS, McCullom NE, Bunnag AP, et al. Inflammation is an independent risk factor for colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis: a case-control study. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013;11(12):1601-8 e1-4.
362. Olen O, Askling J, Sachs MC, Frumento P, Neovius M, Smedby KE, et al. Childhood onset inflammatory bowel disease and risk of cancer: a Swedish nationwide cohort study 1964-2014. *Bmj*. 2017;358:j3951.
363. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2012;10(6):639-45.
364. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48(4):526-35.
365. Zhen Y, Luo C, Zhang H. Early detection of ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Gastroenterology report*. 2018;6(2):83-92.
366. Manne U, Shanmugam C, Katkoori VR, Bumpers HL, Grizzle WE. Development and progression of colorectal neoplasia. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2010;9(1-6):235-65.
367. Mao G, Yuan F, Absher K, Jennings CD, Howard DS, Jordan CT, et al. Preferential loss of mismatch repair function in refractory and relapsed acute myeloid leukemia: potential contribution to AML progression. *Cell research*. 2008;18(2):281-9.
368. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews Genetics*. 2007;8(4):286-98.
369. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2009;361(25):2449-60.

370. Palacio Rúa KM, C. Bases moleculares del cáncer colorrectal. *Iatreia* [online]. 2012;vol.25, n.2:pp.137-48.
371. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
372. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*. 2011;60(1):116-29.
373. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073-87 e3.
374. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
375. Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(2):425-30.
376. Balkwill FR, Mantovani A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in cancer biology*. 2012;22(1):33-40.
377. Burn J, Gerdes AM, Macrae F, Mecklin JP, Moeslein G, Olschwang S, et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2011;378(9809):2081-7.
378. Labayle D, Fischer D, Vielh P, Drouhin F, Pariente A, Bories C, et al. Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*. 1991;101(3):635-9.
379. Kameyama H, Nagahashi M, Shimada Y, Tajima Y, Ichikawa H, Nakano M, et al. Genomic characterization of colitis-associated colorectal cancer. *World journal of surgical oncology*. 2018;16(1):121.
380. Lakatos PL, Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(25):3937-47.
381. Jess T, Simonsen J, Jorgensen KT, Pedersen BV, Nielsen NM, Frisch M. Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology*. 2012;143(2):375-81 e1; quiz e13-4.
382. Keller DS, Windsor A, Cohen R, Chand M. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. *Techniques in coloproctology*. 2019;23(1):3-13.
383. West NR, McCuaig S, Franchini F, Powrie F. Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(10):615-29.
384. Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshtein D, et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(7):2516-25.

385. Westbrook AM, Wei B, Braun J, Schiestl RH. Intestinal mucosal inflammation leads to systemic genotoxicity in mice. *Cancer research*. 2009;69(11):4827-34.
386. Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nature immunology*. 2016;17(3):230-40.
387. Shalapour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(9):3347-55.
388. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073-81.
389. Kraus S, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. *Current opinion in pharmacology*. 2009;9(4):405-10.
390. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006;441(7092):431-6.
391. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
392. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(11):798-809.
393. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(10):749-59.
394. Lee H, Herrmann A, Deng JH, Kujawski M, Niu G, Li Z, et al. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer cell*. 2009;15(4):283-93.
395. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer cell*. 2009;15(2):103-13.
396. Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2005;28(3):187-96.
397. Bollrath J, Greten FR. IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO reports*. 2009;10(12):1314-9.
398. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004;118(3):285-96.
399. Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Current opinion in genetics & development*. 2008;18(1):19-26.
400. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1420-8.

401. Wu Y, Zhou BP. Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. *Cell cycle*. 2009;8(20):3267-73.
402. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(3):178-96.
403. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(4):239-52.
404. Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M, Sakashita H, Manabe T, Shimahara Y, et al. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene*. 2007;26(32):4679-88.
405. Zhang R, Zhang H, Zhu W, Pardee AB, Coffey RJ, Jr., Liang P. Mob-1, a Ras target gene, is overexpressed in colorectal cancer. *Oncogene*. 1997;14(13):1607-10.
406. Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2004;23(1-2):101-17.
407. Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Seminars in immunopathology*. 2013;35(2):229-44.
408. Whiteside TL. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Seminars in cancer biology*. 2012;22(4):327-34.
409. Mager LF, Wasmer MH, Rau TT, Krebs P. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Frontiers in oncology*. 2016;6:96.
410. Liu ZG. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell research*. 2005;15(1):24-7.
411. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(2):560-70.
412. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(5):361-71.
413. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of pathology*. 2008;214(2):149-60.
414. Galluzzi L, Kepp O, Chan FK, Kroemer G. Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annual review of pathology*. 2017;12:103-30.
415. Al Obeed OA, Alkhayal KA, Al Sheikh A, Zubaidi AM, Vaali-Mohammed MA, Boushey R, et al. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha is associated with advanced colorectal cancer stages. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(48):18390-6.
416. Stanilov N, Miteva L, Dobрева Z, Stanilova S. Colorectal cancer severity and survival in correlation with tumour necrosis factor-alpha. *Biotechnology, biotechnological equipment*. 2014;28(5):911-7.
417. Grivennikov SI, Kuprash DV, Liu ZG, Nedospasov SA. Intracellular signals and events activated by cytokines of the tumor necrosis factor

superfamily: From simple paradigms to complex mechanisms. *International review of cytology*. 2006;252:129-61.

418. Kruglov AA, Kuchmiy A, Grivennikov SI, Tumanov AV, Kuprash DV, Nedospasov SA. Physiological functions of tumor necrosis factor and the consequences of its pathologic overexpression or blockade: mouse models. *Cytokine & growth factor reviews*. 2008;19(3-4):231-44.

419. Wang H, Wang HS, Zhou BH, Li CL, Zhang F, Wang XF, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF-alpha requires AKT/GSK-3beta-mediated stabilization of snail in colorectal cancer. *PloS one*. 2013;8(2):e56664.

420. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39(6):1003-18.

421. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(2):89-102.

422. Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, et al. IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *Journal of immunology*. 2011;187(9):4835-43.

423. Matsuo Y, Sawai H, Ma J, Xu D, Ochi N, Yasuda A, et al. IL-1alpha secreted by colon cancer cells enhances angiogenesis: the relationship between IL-1alpha release and tumor cells' potential for liver metastasis. *Journal of surgical oncology*. 2009;99(6):361-7.

424. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(5):329-42.

425. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(7):407-20.

426. Apte RN, Voronov E. Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Seminars in cancer biology*. 2002;12(4):277-90.

427. Kaler P, Augenlicht L, Klampfer L. Macrophage-derived IL-1beta stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene*. 2009;28(44):3892-902.

428. Kaler P, Godasi BN, Augenlicht L, Klampfer L. The NF-kappaB/AKT-dependent Induction of Wnt Signaling in Colon Cancer Cells by Macrophages and IL-1beta. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 2009;2(1):69-80.

429. Elaraj DM, Weinreich DM, Varghese S, Puhlmann M, Hewitt SM, Carroll NM, et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(4):1088-96.

430. Viet HT, Wagsater D, Hugander A, Dimberg J. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in human colorectal cancer. *Oncology reports*. 2005;14(4):915-8.

431. Wang Y, Wang K, Han GC, Wang RX, Xiao H, Hou CM, et al. Neutrophil infiltration favors colitis-associated tumorigenesis by activating the interleukin-1 (IL-1)/IL-6 axis. *Mucosal immunology*. 2014;7(5):1106-15.
432. Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of translational medicine*. 2006;4:48.
433. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(5):2645-50.
434. Sun Z, Wang S, Zhao RC. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *Journal of hematology & oncology*. 2014;7:14.
435. Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(5):2256-61.
436. Zaki MH, Vogel P, Body-Malapel M, Lamkanfi M, Kanneganti TD. IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *Journal of immunology*. 2010;185(8):4912-20.
437. Salcedo R, Worschech A, Cardone M, Jones Y, Gyulai Z, Dai RM, et al. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(8):1625-36.
438. Voronov E, Apte RN. IL-1 in Colon Inflammation, Colon Carcinogenesis and Invasiveness of Colon Cancer. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 2015;8(3):187-200.
439. Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, Hue S, Gorelick PL, McKenzie BS, et al. IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced T cell-dependent colitis. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(11):2485-94.
440. Ljubic B, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pavlovic S, Zdravkovic N, Milovanovic M, et al. Elevated serum level of IL-23 correlates with expression of VEGF in human colorectal carcinoma. *Archives of medical research*. 2010;41(3):182-9.
441. Zhang L, Li J, Li L, Zhang J, Wang X, Yang C, et al. IL-23 selectively promotes the metastasis of colorectal carcinoma cells with impaired Socs3 expression via the STAT5 pathway. *Carcinogenesis*. 2014;35(6):1330-40.
442. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology*. 2007;8(9):967-74.

443. Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Carcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, et al. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity*. 2008;28(4):559-70.
444. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(5):1310-6.
445. Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ, et al. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature*. 2010;464(7293):1371-5.
446. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004;21(4):467-76.
447. Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PD, et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut*. 2012;61(12):1693-700.
448. Grivnenkov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 2012;491(7423):254-8.
449. Hyun YS, Han DS, Lee AR, Eun CS, Youn J, Kim HY. Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33(4):931-6.
450. He D, Li H, Yusuf N, Elmetts CA, Li J, Mountz JD, et al. IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology*. 2010;184(5):2281-8.
451. Wu P, Wu D, Ni C, Ye J, Chen W, Hu G, et al. gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity*. 2014;40(5):785-800.
452. Lotti F, Jarrar AM, Pai RK, Hitomi M, Lathia J, Mace A, et al. Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(13):2851-72.
453. Chung AS, Wu X, Zhuang G, Ngu H, Kasman I, Zhang J, et al. An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature medicine*. 2013;19(9):1114-23.
454. Rutz S, Wang X, Ouyang W. The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(12):783-95.
455. Zindl CL, Lai JF, Lee YK, Maynard CL, Harbour SN, Ouyang W, et al. IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(31):12768-73.

456. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(2):534-44.
457. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S, Flavell RA. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity*. 2008;29(6):947-57.
458. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature medicine*. 2008;14(3):282-9.
459. Wu T, Wang Z, Liu Y, Mei Z, Wang G, Liang Z, et al. Interleukin 22 protects colorectal cancer cells from chemotherapy by activating the STAT3 pathway and inducing autocrine expression of interleukin 8. *Clinical immunology*. 2014;154(2):116-26.
460. Kryczek I, Lin Y, Nagarsheth N, Peng D, Zhao L, Zhao E, et al. IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity*. 2014;40(5):772-84.
461. Putoczki TL, Thiem S, Loving A, Busuttill RA, Wilson NJ, Ziegler PK, et al. Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. *Cancer cell*. 2013;24(2):257-71.
462. Yoshizaki A, Nakayama T, Yamazumi K, Yakata Y, Taba M, Sekine I. Expression of interleukin (IL)-11 and IL-11 receptor in human colorectal adenocarcinoma: IL-11 up-regulation of the invasive and proliferative activity of human colorectal carcinoma cells. *International journal of oncology*. 2006;29(4):869-76.
463. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Iglesias M, Cespedes MV, et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer cell*. 2012;22(5):571-84.
464. Feagins LA. Role of transforming growth factor-beta in inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(11):1963-8.
465. Hawinkels LJ, Paauwe M, Verspaget HW, Wiercinska E, van der Zon JM, van der Ploeg K, et al. Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF-beta signaling in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene*. 2014;33(1):97-107.
466. Engle SJ, Hoying JB, Boivin GP, Ormsby I, Gartside PS, Doetschman T. Transforming growth factor beta1 suppresses nonmetastatic colon cancer at an early stage of tumorigenesis. *Cancer research*. 1999;59(14):3379-86.
467. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity*. 2004;21(4):491-501.

468. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llargo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, et al. TGFbeta drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*. 2018;554(7693):538-43.
469. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual review of immunology*. 2011;29:71-109.
470. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of immunology*. 1991;147(11):3815-22.
471. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(4):915-24.
472. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *The New England journal of medicine*. 2009;361(21):2033-45.
473. Glocker EO, Kotlarz D, Klein C, Shah N, Grimbacher B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1246:102-7.
474. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75(2):263-74.
475. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and immunity*. 1998;66(11):5224-31.
476. Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, Muller W, Menon S, Holland G, et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(4):1010-20.
477. O'Hara RJ, Greenman J, MacDonald AW, Gaskell KM, Topping KP, Duthie GS, et al. Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced interleukin 10 production. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1998;4(8):1943-8.
478. Miteva LD, Stanilov NS, Deliysky TS, Stanilova SA. Significance of -1082A/G polymorphism of IL10 gene for progression of colorectal cancer and IL-10 expression. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(12):12655-64.
479. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*. 2008;28(4):546-58.

480. Wehinger J, Gouilleux F, Groner B, Finke J, Mertelsmann R, Weber-Nordt RM. IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS letters*. 1996;394(3):365-70.
481. Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. *International journal of biological sciences*. 2012;8(9):1248-53.
482. Grivennikov S, Karin M. Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? *Cancer cell*. 2008;13(1):7-9.
483. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989;74(1):1-10.
484. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(3):109-19.
485. Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *British journal of cancer*. 2014;110(2):469-78.
486. Xu H, Lai W, Zhang Y, Liu L, Luo X, Zeng Y, et al. Tumor-associated macrophage-derived IL-6 and IL-8 enhance invasive activity of LoVo cells induced by PRL-3 in a KCNN4 channel-dependent manner. *BMC cancer*. 2014;14:330.
487. Johnston PA, Grandis JR. STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges. *Molecular interventions*. 2011;11(1):18-26.
488. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer research*. 2007;67(20):10019-26.
489. Brighenti E, Calabrese C, Liguori G, Giannone FA, Trere D, Montanaro L, et al. Interleukin 6 downregulates p53 expression and activity by stimulating ribosome biogenesis: a new pathway connecting inflammation to cancer. *Oncogene*. 2014;33(35):4396-406.
490. Tseng-Rogenski SS, Hamaya Y, Choi DY, Carethers JM. Interleukin 6 alters localization of hMSH3, leading to DNA mismatch repair defects in colorectal cancer cells. *Gastroenterology*. 2015;148(3):579-89.
491. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*. 1994;107(4):1183-8.
492. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer research*. 1995;55(17):3785-9.

493. Sinicrope FA, Gill S. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2004;23(1-2):63-75.
494. Pugh S, Thomas GA. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut*. 1994;35(5):675-8.
495. Yang VW, Shields JM, Hamilton SR, Spannhake EW, Hubbard WC, Hyland LM, et al. Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer research*. 1998;58(8):1750-3.
496. Kawamori T, Uchiya N, Sugimura T, Wakabayashi K. Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E2 administration. *Carcinogenesis*. 2003;24(5):985-90.
497. Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science*. 2005;310(5753):1504-10.
498. Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nature medicine*. 1999;5(12):1418-23.
499. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(7):3336-40.
500. Khayrullina T, Yen JH, Jing H, Ganea D. In vitro differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E2 alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of Th17 cells. *Journal of immunology*. 2008;181(1):721-35.
501. Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*. 2017;8(5):761-73.
502. Garagnani P, Pirazzini C, Franceschi C. Colorectal cancer microenvironment: among nutrition, gut microbiota, inflammation and epigenetics. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(4):765-78.
503. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
504. Atreya I, Neurath MF. Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert review of anticancer therapy*. 2008;8(4):561-72.
505. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(3):162-74.
506. Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(5):1472-9.

507. Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, Rutegard J, Oberg A, Oldenborg PA, et al. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PloS one*. 2012;7(10):e47045.
508. Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PloS one*. 2012;7(12):e50946.
509. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002;23(11):549-55.
510. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(1):71-8.
511. Jass JR. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *Journal of clinical pathology*. 1986;39(6):585-9.
512. Guidoboni M, Gafa R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Santini A, et al. Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *The American journal of pathology*. 2001;159(1):297-304.
513. Waldner MJ, Neurath MF. Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Seminars in immunopathology*. 2009;31(2):249-56.
514. Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H, et al. Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *International journal of cancer*. 2006;118(9):2232-6.
515. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 2006;86(3):231-45.
516. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;21(2):137-48.
517. Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*. 2006;442(7101):461-5.
518. Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunological reviews*. 2008;226:87-102.
519. Erdman SE, Sohn JJ, Rao VP, Nambiar PR, Ge Z, Fox JG, et al. CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice. *Cancer research*. 2005;65(10):3998-4004.
520. Clarke SL, Betts GJ, Plant A, Wright KL, El-Shanawany TM, Harrop R, et al. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PloS one*. 2006;1:e129.
521. Ling KL, Pratap SE, Bates GJ, Singh B, Mortensen NJ, George BD, et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour

- infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer immunity*. 2007;7:7.
522. Wesch D, Peters C, Siegers GM. Human gamma delta T regulatory cells in cancer: fact or fiction? *Frontiers in immunology*. 2014;5:598.
523. Paul S, Lal G. Regulatory and effector functions of gamma-delta (gammadelta) T cells and their therapeutic potential in adoptive cellular therapy for cancer. *International journal of cancer*. 2016;139(5):976-85.
524. Dadabayev AR, Sandel MH, Menon AG, Morreau H, Melief CJ, Offringa R, et al. Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2004;53(11):978-86.
525. Suzuki A, Masuda A, Nagata H, Kameoka S, Kikawada Y, Yamakawa M, et al. Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma. *The Journal of pathology*. 2002;196(1):37-43.
526. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2003;21:685-711.
527. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70.
528. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(3):173-82.
529. Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*. 2012;33(5):949-55.
530. Granot Z, Jablonska J. Distinct Functions of Neutrophil in Cancer and Its Regulation. *Mediators of inflammation*. 2015;2015:701067.
531. Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nature reviews Cancer*. 2016;16(7):431-46.
532. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(5):1137-46.
533. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(1):24-37.
534. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nature reviews Cancer*. 2016;16(1):7-19.
535. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(4):239-52.
536. Tartter PI, Steinberg B, Barron DM, Martinelli G. The prognostic significance of natural killer cytotoxicity in patients with colorectal cancer. *Archives of surgery*. 1987;122(11):1264-8.
537. McEwen-Smith RM, Salio M, Cerundolo V. The regulatory role of invariant NKT cells in tumor immunity. *Cancer immunology research*. 2015;3(5):425-35.

538. Rhost S, Sedimbi S, Kadri N, Cardell SL. Immunomodulatory type II natural killer T lymphocytes in health and disease. *Scandinavian journal of immunology*. 2012;76(3):246-55.
539. Wang Y, Sedimbi S, Lofbom L, Singh AK, Porcelli SA, Cardell SL. Unique invariant natural killer T cells promote intestinal polyps by suppressing TH1 immunity and promoting regulatory T cells. *Mucosal immunology*. 2018;11(1):131-43.
540. Chiossone L, Dumas PY, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nature reviews Immunology*. 2018;18(11):671-88.
541. Forkel M, van Tol S, Hoog C, Michaelsson J, Almer S, Mjosberg J. Distinct Alterations in the Composition of Mucosal Innate Lymphoid Cells in Newly Diagnosed and Established Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Journal of Crohn's & colitis*. 2019;13(1):67-78.
542. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134(2):577-94.
543. Othman M, Aguero R, Lin HC. Alterations in intestinal microbial flora and human disease. *Current opinion in gastroenterology*. 2008;24(1):11-6.
544. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003;361(9356):512-9.
545. Clavel T, Haller D. Bacteria- and host-derived mechanisms to control intestinal epithelial cell homeostasis: implications for chronic inflammation. *Inflammatory bowel diseases*. 2007;13(9):1153-64.
546. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282-6.
547. Gueimonde M, Ouwehand A, Huhtinen H, Salminen E, Salminen S. Qualitative and quantitative analyses of the bifidobacterial microbiota in the colonic mucosa of patients with colorectal cancer, diverticulitis and inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2007;13(29):3985-9.
548. Uronis JM, Muhlbauer M, Herfarth HH, Rubinas TC, Jones GS, Jobin C. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PloS one*. 2009;4(6):e6026.
549. Rowland IR. The role of the gastrointestinal microbiota in colorectal cancer. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(13):1524-7.
550. Sansonetti PJ, Medzhitov R. Learning tolerance while fighting ignorance. *Cell*. 2009;138(3):416-20.
551. Scanlan PD, Shanahan F, Clune Y, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Riordan M, et al. Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environmental microbiology*. 2008;10(3):789-98.

552. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature medicine*. 2009;15(9):1016-22.
553. Huycke MM, Abrams V, Moore DR. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis*. 2002;23(3):529-36.
554. Krebs C. Experimenteller Alkoholkrebs bei weissen Mäusen. *Z Immun Exp Therap*. 1928;50:203-18.
555. Weisburger JH, Reddy BS, Wynder EL. Colon cancer: its epidemiology and experimental production. *Cancer*. 1977;40(5 Suppl):2414-20.
556. Chang WW. Histogenesis of symmetrical 1,2-dimethylhydrazine-induced neoplasms of the colon in the mouse. *Journal of the National Cancer Institute*. 1978;60(6):1405-18.
557. Nambiar PR, Girnun G, Lillo NA, Guda K, Whiteley HE, Rosenberg DW. Preliminary analysis of azoxymethane induced colon tumors in inbred mice commonly used as transgenic/knockout progenitors. *International journal of oncology*. 2003;22(1):145-50.
558. Kanneganti M, Mino-Kenudson M, Mizoguchi E. Animal models of colitis-associated carcinogenesis. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:342637.
559. Delker DA, McKnight SJ, 3rd, Rosenberg DW. The role of alcohol dehydrogenase in the metabolism of the colon carcinogen methylazoxymethanol. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 1998;45(1):66-71.
560. Vivona AA, Shpitz B, Medline A, Bruce WR, Hay K, Ward MA, et al. K-ras mutations in aberrant crypt foci, adenomas and adenocarcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1993;14(9):1777-81.
561. Hata K, Yamada Y, Kuno T, Hirose Y, Hara A, Qiang SH, et al. Tumor formation is correlated with expression of beta-catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer science*. 2004;95(4):316-20.
562. Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2009;30(2):183-96.
563. Kobaek-Larsen M, Thorup I, Diederichsen A, Fenger C, Hoitinga MR. Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. *Comparative medicine*. 2000;50(1):16-26.
564. Neufert C, Becker C, Neurath MF. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nature protocols*. 2007;2(8):1998-2004.
565. Maltzman T, Whittington J, Driggers L, Stephens J, Ahnen D. AOM-induced mouse colon tumors do not express full-length APC protein. *Carcinogenesis*. 1997;18(12):2435-9.

566. Takahashi M, Nakatsugi S, Sugimura T, Wakabayashi K. Frequent mutations of the beta-catenin gene in mouse colon tumors induced by azoxymethane. *Carcinogenesis*. 2000;21(6):1117-20.
567. Wang QS, Papanikolaou A, Sabourin CL, Rosenberg DW. Altered expression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 in azoxymethane-induced mouse colon tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 1998;19(11):2001-6.
568. Erdman SH, Wu HD, Hixson LJ, Ahnen DJ, Gerner EW. Assessment of mutations in Ki-ras and p53 in colon cancers from azoxymethane- and dimethylhydrazine-treated rats. *Molecular carcinogenesis*. 1997;19(2):137-44.
569. Shivapurkar N, Belinsky SA, Wolf DC, Tang Z, Alabaster O. Absence of p53 gene mutations in rat colon carcinomas induced by azoxymethane. *Cancer letters*. 1995;96(1):63-70.
570. Hu Y, Le Leu RK, Young GP. Absence of acute apoptotic response to genotoxic carcinogens in p53-deficient mice is associated with increased susceptibility to azoxymethane-induced colon tumours. *International journal of cancer*. 2005;115(4):561-7.
571. Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1805(1):53-71.
572. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74.
573. Wallis RS. Biologics and infections: lessons from tumor necrosis factor blocking agents. *Infectious disease clinics of North America*. 2011;25(4):895-910.
574. Salliot C, Dougados M, Gossec L. Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheumatoid arthritis: meta-analyses of randomised placebo-controlled trials. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(1):25-32.
575. Campbell L, Chen C, Bhagat SS, Parker RA, Ostor AJ. Risk of adverse events including serious infections in rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab: a systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Rheumatology*. 2011;50(3):552-62.
576. Salvana EM, Salata RA. Infectious complications associated with monoclonal antibodies and related small molecules. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(2):274-90, Table of Contents.
577. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England journal of medicine*. 2001;345(15):1098-104.
578. Stone J. <http://www.uptodate.com>. 2015.
579. Martinez-Lostao L. Immunological Cytotoxic Factors. John Wiley & Sons, Ltd 2013.

580. Pardo J, Simon MM, Froelich CJ. Granzyme A is a proinflammatory protease. *Blood*. 2009;114(18):3968; author reply 9-70.
581. Nishiyama T, Mishima K, Obara K, Inoue H, Doi T, Kondo S, et al. Amelioration of lacrimal gland inflammation by oral administration of K-13182 in Sjogren's syndrome model mice. *Clinical and experimental immunology*. 2007;149(3):586-95.
582. Napoli AM, Fast LD, Gardiner F, Nevola M, Machan JT. Increased granzyme levels in cytotoxic T lymphocytes are associated with disease severity in emergency department patients with severe sepsis. *Shock*. 2012;37(3):257-62.
583. Pekiner FN, Demirel GY, Borahan MO, Ozbayrak S. Evaluation of cytotoxic T-cell activation, chemokine receptors, and adhesion molecules in blood and serum in patients with oral lichen planus. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2012;41(6):484-9.
584. Ilzecka J. Granzymes A and B levels in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical biochemistry*. 2011;44(8-9):650-3.
585. Accardo-Palumbo A, Ferrante A, Cadelo M, Ciccio F, Parrinello G, Lipari L, et al. The level of soluble Granzyme A is elevated in the plasma and in the Vgamma9/Vdelta2 T cell culture supernatants of patients with active Behcet's disease. *Clinical and experimental rheumatology*. 2004;22(4 Suppl 34):S45-9.
586. Guay C, Laviolette M, Tremblay GM. Targeting serine proteases in asthma. *Current topics in medicinal chemistry*. 2006;6(4):393-402.
587. Wilson JA, Prow NA, Schroder WA, Ellis JJ, Cumming HE, Gearing LJ, et al. RNA-Seq analysis of chikungunya virus infection and identification of granzyme A as a major promoter of arthritic inflammation. *PLoS pathogens*. 2017;13(2):e1006155.
588. Simon MM, Hausmann M, Tran T, Ebnet K, Tschopp J, ThaHla R, et al. In vitro- and ex vivo-derived cytolytic leukocytes from granzyme A x B double knockout mice are defective in granule-mediated apoptosis but not lysis of target cells. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(10):1781-6.
589. Menea C, Kurihara N, Roodman GD. CFU-GM-derived cells form osteoclasts at a very high efficiency. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;267(3):943-6.
590. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature protocols*. 2007;2(3):541-6.
591. Boulard O, Kirchberger S, Royston DJ, Maloy KJ, Powrie FM. Identification of a genetic locus controlling bacteria-driven colitis and associated cancer through effects on innate inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(7):1309-24.
592. Franci C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gomez S, Rodriguez R, et al. Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene*. 2006;25(37):5134-44.

593. Tuominen VJ, Ruotoistenmaki S, Viitanen A, Jumppanen M, Isola J. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast cancer research : BCR*. 2010;12(4):R56.
594. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*. 2013;41(Database issue):D590-6.
595. Corbett TH, Griswold DP, Jr., Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM, Jr. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer research*. 1975;35(9):2434-9.
596. Collin-Osdoby P, Yu X, Zheng H, Osdoby P. RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. *Methods in molecular medicine*. 2003;80:153-66.
597. Zal T, Volkman A, Stockinger B. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(6):2089-99.
598. Sanz-Pamplona R, Berenguer A, Cordero D, Mollevi DG, Crous-Bou M, Sole X, et al. Aberrant gene expression in mucosa adjacent to tumor reveals a molecular crosstalk in colon cancer. *Molecular cancer*. 2014;13:46.
599. Subramanian AR, Weyer-Menkoff J, Kaufmann M, Morgenstern B. DIALIGN-T: an improved algorithm for segment-based multiple sequence alignment. *BMC bioinformatics*. 2005;6:66.
600. Arend WP. Cytokines and cellular interactions in inflammatory synovitis. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(9):1081-2.
601. Smeets TJ, Kraan MC, Galjaard S, Youssef PP, Smith MD, Tak PP. Analysis of the cell infiltrate and expression of matrix metalloproteinases and granzyme B in paired synovial biopsy specimens from the cartilage-pannus junction in patients with RA. *Annals of the rheumatic diseases*. 2001;60(6):561-5.
602. Roday HK, van der Laan WH, Tak PP, de Roos JA, Bank RA, TeKoppele JM, et al. Human granzyme B mediates cartilage proteoglycan degradation and is expressed at the invasive front of the synovium in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2001;40(1):55-61.
603. Griffiths GM, Alpert S, Lambert E, McGuire J, Weissman IL. Perforin and granzyme A expression identifying cytolytic lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(2):549-53.
604. Kummer JA, Tak PP, Brinkman BM, van Tilborg AA, Kamp AM, Verweij CL, et al. Expression of granzymes A and B in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clinical immunology and immunopathology*. 1994;73(1):88-95.

605. 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.
606. Mewar D, Wilson AG. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2006;60(10):648-55.
607. Warrington KJ, Takemura S, Goronzy JJ, Weyand CM. CD4+,CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(1):13-20.
608. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Experimental hematology*. 1999;27(8):1229-41.
609. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine reviews*. 1999;20(3):345-57.
610. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289(5484):1504-8.
611. Szulc P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2008;19(12):1683-704.
612. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annual review of immunology*. 2001;19:163-96.
613. Gravallesse EM. Bone destruction in arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2002;61 Suppl 2:ii84-6.
614. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(12):1481-8.
615. Redlich K, Hayer S, Ricci R, David JP, Tohidast-Akrad M, Kollias G, et al. Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(10):1419-27.
616. Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM. Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(6):821-31.
617. Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone*. 2002;30(2):340-6.
618. Soderstrom K, Stein E, Colmenero P, Purath U, Muller-Ladner U, de Matos CT, et al. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(29):13028-33.

619. Bauer K, Knipper A, Tu-Rapp H, Koczan D, Kreutzer HJ, Nizze H, et al. Perforin deficiency attenuates collagen-induced arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(4):R877-84.
620. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes & development*. 1999;13(18):2412-24.
621. Devlin RD, Reddy SV, Savino R, Ciliberto G, Roodman GD. IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)2D3, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1998;13(3):393-9.
622. Reddy SV, Takahashi S, Dallas M, Williams RE, Neckers L, Roodman GD. Interleukin-6 antisense deoxyoligonucleotides inhibit bone resorption by giant cells from human giant cell tumors of bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1994;9(5):753-7.
623. Abu-Amer Y, Ross FP, Edwards J, Teitelbaum SL. Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its P55 receptor. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(6):1557-65.
624. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(2):275-86.
625. Matsumoto M, Sudo T, Maruyama M, Osada H, Tsujimoto M. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is crucial in osteoclastogenesis induced by tumor necrosis factor. *FEBS letters*. 2000;486(1):23-8.
626. Zou W, Hakim I, Tschoep K, Endres S, Bar-Shavit Z. Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. *Journal of cellular biochemistry*. 2001;83(1):70-83.
627. Kitaura H, Sands MS, Aya K, Zhou P, Hirayama T, Uthgenannt B, et al. Marrow stromal cells and osteoclast precursors differentially contribute to TNF-alpha-induced osteoclastogenesis in vivo. *Journal of immunology*. 2004;173(8):4838-46.
628. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(10):1229-37.
629. Chabaud M, Miossec P. The combination of tumor necrosis factor alpha blockade with interleukin-1 and interleukin-17 blockade is more effective for controlling synovial inflammation and bone resorption in an ex vivo model. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(6):1293-303.
630. Saxne T, Palladino MA, Jr., Heinegard D, Talal N, Wollheim FA. Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis and rheumatism*. 1988;31(8):1041-5.

631. Olivares-Villagomez D, Van Kaer L. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. *Trends in immunology*. 2018;39(4):264-75.
632. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current protocols in immunology* / edited by John E Coligan [et al]. 2014;104:Unit 15 25.
633. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG, National Centre for the Replacement R, et al. Animal research: reporting in vivo experiments--the ARRIVE guidelines. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2011;31(4):991-3.
634. Acosta E, Gonzalez MG, Sorichetti PA, Santiago GD. Laser-induced bubble generation on a gold nanoparticle: A nonsymmetrical description. *Physical review E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*. 2015;92(6):062301.
635. Fichtner-Feigl S, Kesselring R, Strober W. Chronic inflammation and the development of malignancy in the GI tract. *Trends in immunology*. 2015;36(8):451-9.
636. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
637. De Robertis M, Massi E, Poeta ML, Carotti S, Morini S, Cecchetelli L, et al. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of carcinogenesis*. 2011;10:9.
638. Takahashi M, Fukuda K, Sugimura T, Wakabayashi K. Beta-catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. *Cancer research*. 1998;58(1):42-6.
639. Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer cell*. 2009;15(2):91-102.
640. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Nunez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(5):321-35.
641. Rodicio Mdel R, Mendoza Mdel C. [Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2004;22(4):238-45.
642. Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral diseases*. 2017;23(3):276-86.
643. Montonye DR, Ericsson AC, Busi SB, Lutz C, Wardwell K, Franklin CL. Acclimation and Institutionalization of the Mouse Microbiota Following Transportation. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:1085.

644. Ericsson AC, Gagliardi J, Bouhan D, Spollen WG, Givan SA, Franklin CL. The influence of caging, bedding, and diet on the composition of the microbiota in different regions of the mouse gut. *Scientific reports*. 2018;8(1):4065.
645. Salama P, Phillips M, Platell C, Iacopetta B. Low expression of Granzyme B in colorectal cancer is associated with signs of early metastatic invasion. *Histopathology*. 2011;59(2):207-15.
646. Waldner MJ, Wirtz S, Becker C, Seidel D, Tubbe I, Cappel K, et al. Perforin deficiency attenuates inflammation and tumor growth in colitis-associated cancer. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(4):559-67.
647. Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunology letters*. 2009;123(2):97-102.
648. Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(3):378-89.
649. Wang W, Li X, Zheng D, Zhang D, Peng X, Zhang X, et al. Dynamic changes and functions of macrophages and M1/M2 subpopulations during ulcerative colitis-associated carcinogenesis in an AOM/DSS mouse model. *Molecular medicine reports*. 2015;11(4):2397-406.
650. Li S, Wang N, Brodt P. Metastatic cells can escape the proapoptotic effects of TNF-alpha through increased autocrine IL-6/STAT3 signaling. *Cancer research*. 2012;72(4):865-75.
651. Crusz SM, Balkwill FR. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nature reviews Clinical oncology*. 2015;12(10):584-96.
652. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Krasnova Y, Putoczki T, Miles K, MacDonald KP, Town L, et al. Granzyme M has a critical role in providing innate immune protection in ulcerative colitis. *Cell death & disease*. 2016;7:e2302.
653. Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nature reviews Rheumatology*. 2017;13(7):399-409.
654. Shabo I, Olsson H, Elkarim R, Sun XF, Svanvik J. Macrophage Infiltration in Tumor Stroma is Related to Tumor Cell Expression of CD163 in Colorectal Cancer. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 2014;7(1-2):61-9.
655. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annual review of immunology*. 1996;14:207-32.
656. Kagi D, Odermatt B, Mak TW. Homeostatic regulation of CD8+ T cells by perforin. *European journal of immunology*. 1999;29(10):3262-72.
657. Spaner D, Raju K, Rabinovich B, Miller RG. A role for perforin in activation-induced T cell death in vivo: increased expansion of allogeneic perforin-deficient T cells in SCID mice. *Journal of immunology*. 1999;162(2):1192-9.

658. Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhawan S, Certain S, Mathew PA, et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science*. 1999;286(5446):1957-9.