



Universitat de Lleida

Estudis de la Resposta Immunitària en els contextos d'Autoimmunitat i Immunitat Tumoral: models de Diabetis Tipus 1 i Melanoma Cutani

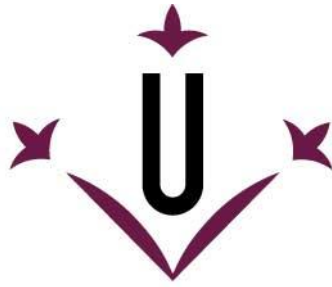
Marta Corral Pujol

<http://hdl.handle.net/10803/673097>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

**Estudis de la Resposta Immunitària en els
contextos d'Autoimmunitat i Immunitat Tumoral:
models de Diabetis Tipus 1 i Melanoma Cutani**

Marta Corral i Pujol

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida

Programa de Doctorat en Salut

Director i Tutor

Joan Verdaguer i Autonell

2021

La tesi doctoral titulada “Estudis de la Resposta Immunitària en els contextos d'Autoimmunitat i Immunitat Tumoral: models de Diabetis Tipus 1 i Melanoma Cutani” ha estat realitzada per la Marta Corral Pujol, sota la direcció del Dr. Joan Verdaguer Autonell, en major part en el laboratori de la Unitat d'Immunologia i Immunopatologia de la Universitat de Lleida/IRB Lleida i, en una petita part, en el laboratori de teràpia gènica del Institut de Recerca de Vall d'Hebrón.

Els treballs de recerca d'aquesta tesi han estat finançats a través del projecte *Respuesta de linfocitos T y B anti-periferina y anti-cromogranina durante el desarrollo de la Diabetes tipo 1* amb el número de referència SAF2016-77227-R del *Ministerio de Economía y Competitividad* (MEYC) del Govern Espanyol; mitjançant el CIBER de Diabetis i Malalties metabòliques associades (CIBERDEM), iniciativa de l'*Instituto de Salud Carlos III*; i a través del programa d'Indústria del Coneixement amb el projecte LLAV-00045.

La doctoranda

El director de tesi:

Marta Corral i Pujol

Dr. Joan Verdaguer i Autonell

Professor agregat d'Immunologia,

Dept. Medicina Experimental,

Universitat de Lleida

A la mama i el papa.

Sempre recordaré el que em va dir la meva mare quan vaig deixar la feina de Barcelona per tornar a Lleida a fer la tesi: *Marta, avui has tornat a somriure*. Ja fa 4 anys d'això i, des d'aleshores, no m'he desfet d'aquesta rialla. I és que aquí he comptat amb totes aquelles persones que allà em faltaven, sense les quals aquest camí no hauria estat el mateix. És a tota aquesta gent a qui ara, en la recta final, vull donar les gràcies.

Primer de tot, m'agradaria agrair al Dr. Joan Verdaguer la seva confiança en mi al llarg de tot aquest temps, per obrir els braços a la filla pròdiga i deixar-me tornar al seu laboratori per a fer la tesi. Gràcies per transmetre'm el teu entusiasme per la immunologia i per guiar-me en tot moment. Per donar-me l'oportunitat d'estar al peu de la batalla amb *Nema Therapeutics*. Per acompanyar-me en tot aquest camí d'aprenentatge i ajudar-me a créixer tant a nivell professional com personal. Però sobretot, per ser no només un gran cap sinó una gran persona.

A la gent del laboratori d'immunologia (tant passada com present). A la Dra. Conxi Mora, per estar sempre pendent del bon funcionament del laboratori. A l'Estela, per ajudar-me a donar les primeres passes quan feia el TFG. A la Rosa i la Lídia, les millors tècnics que podem tenir, sempre disposades a donar un cop de mà. A la Lorena, nouvinguda, per animar el laboratori amb cantarelles involuntàries. A la Júlia, per la competició sana per la cabina de cultius que ens ha convertit en les més ràpides fent canvis de medi. A totes les alumnes de pràctiques però, especialment, a la Dana, no només per ajudar-me en tot el possible, sinó per compartir amb mi els períodes de vacances al laboratori i alimentar-me amb tot de coses bones de Moldàvia. Saps que, malgrat que hagi decidit prioritzar la carrera, sempre seràs la meva *pollito* preferida. A la Celia, per *emprendre* juntes mil viatges a Barcelona i convertir-nos en unes expertes en models de negoci i *Elevator Pitches*. Ens queda pendent un bol de *avena*! Però, sobretot, gràcies Leire, per les hores xafardejant al citòmetre, per ser la meva guia mentre vas estar al laboratori i per ensenyar-me com continuar endavant quan vas decidir tornar a casa.

A tota la gent que he conegut pel camí, en especial al Dr. Jordi Barquinero i a la Rocío, per cuidar-me durant l'estada al VHIR i tractar-me com si fos una més. Per ensenyar-me que els dijous, amb una mica de dolç sempre són millors.

A tots els amics del IRB. A les noies del *Consejo de Sabias*, gràcies per fer que els dinars fossin el millor moment del dia. Gràcies Marta BQ pel teu inacabable entusiasme i el teu etern optimisme. Perquè per molt que em diguis que "*al final no em coneixeràs*", sé que

mai ens allunyarem tant com per a que sigui així. Gràcies Arabela per la teva bondat i serenitat davant qualsevol situació. I per fer totes les manualitats de les últimes tesis, inclosa la meva, segur! A l'Alba, per compartir la desesperació al compensar el citòmetre i a l'enfocar al confocal, fent aquests moments molt menys estressants. A la Rosa, per ser sempre tant clara i sincera, sobretot quan cal dir les veritats sobre Lékué. I Anaïs, gràcies per donar-nos un model de super-dóna a seguir. Per ensenyar-nos el que és la perseverança, la paciència, l'amabilitat i un llarg etcètera de coses que fan que, per molt que no ho vulguis, siguis el nostre exemple a seguir. Gràcies també a la Lia i l'Adrià, pels infinits cafès analitzant els quadres més estrambòtics de l'IRB, compartint mil anècdotes i recuperant energies per a seguir treballant. I gràcies, Leila, no només per ajudar-me al laboratori, sinó per convertir-te en una amiga fora d'aquest. Posa't les piles que demà anem al Ekke! Aviat toca partir síndries amb la panxa.

A tota la família de Lleida, la que s'escull. Gràcies Dani, Eva, Mariona, Oriol, Judit, Andreu, Pol, Marlon... per els sopars, viatges, festes i excursions (tant les que faig com les que no). Gràcies per totes les hores compartides que han fet que el temps passi volant. Però, sobretot, gràcies Anna per tots aquests anys d'amistat i tots els records generats. Per no jutjar-me el primer dia de carrera, la qual cosa fa que ara puguem celebrar el nostre 10è aniversari. Perquè, ara que pandèmies i tesis ens ho permetran, tornarem a viatjar, a fer el mico allà on anem, a descobrir nous restaurants (compartint sempre el menú) i a celebrar juntes totes les coses bones que ens queden per passar. Gràcies a les meves metgesses preferides, la Xis i l'Ana. Perquè ens veiem poc, però quan ho fem és com si no haguessin passat els anys. I no puc parlar de la família de Lleida sense fer menció especial al Hafid. Gràcies per les aventures duaneres i les truites de patata allà on anem. Per formar sempre part de la meva vida, aconsellar-me i donar-me suport en els millors moments, però sobretot, en els més dolents.

A Jorge, gracias por ayudarme a gestionar el estrés de estos últimos meses de la mejor forma posible. Por descubrirme un mundo nuevo. Por enseñarme partes de mí que ni tan solo yo era consciente que existían.

A la gent de Tarragona. A les *Xurris*, retrobades gràcies al confinament, per les videotrucades dels dissabtes a la tarda fent Kahoots, dibuixant, ballant i cuinant. I als *Figaflors* perquè, malgrat estar dispersats arreu del mon, sempre estem units, trobant temps

per calçotades, festivals o, simplement, un *birreo* a la plaça de la Font. Espero tenir-vos sempre al meu costat, a tots i cada un de vosaltres, sou increïbles!

Però, sobretot, vull donar les gràcies a la meva família, perquè sense ells estic segura que no hauria arribat fins aquí. Gràcies, mama, per donar-me sempre els millors consells. Gràcies, papa, per deixar sempre qualsevol cosa per estar amb la teva nena. Als dos, per lluitar sempre pels vostres fills i ajudar-nos a perseguir els nostres somnis. Per donar-nos el millor futur possible. Sense vosaltres tot aquest camí no hagués estat possible. Petit, gràcies per ser com ets, únic. Gràcies àvia Dolors, per interessar-te tant per la meva carrera fins al punt de llegir-te tots els meus apunts. Ara t'esperen 270 pàgines de tesi! Àvia Montse, gràcies per fer-me els millors quadres del mon. I gràcies a tota la resta, que si enumerés un per un, els agraïments serien més llargs que la pròpia tesi. Gràcies als avis, a totes les tietes i tiets, cosines i cosins, per formar part d'aquesta família enorme i, alhora, indestructible.

Per últim, Jaume, gràcies per ser com ets, per donar-me suport durant tot aquest temps i ajudar-me en tot el que estava al teu abast i més. Per ensenyar-me mil coses diferents. Per fer-me riure sempre i cuidar-me cada dia. A tu i a la Honey, per crear junts una família. Per tot el que ens queda per viure, junts.

A tots vosaltres, amb un somriure immens,

Moltes gràcies.

Índex de continguts

RESUMS.....	17
ABREVIACIONS.....	25
INTRODUCCIÓ.....	31
1. Immunitat innata cel·lular.....	33
1.1. Monòcits i Macròfags.....	33
1.2. Granulòcits.....	35
1.3. Cèl·lules dendrítiques.....	36
1.4. Cèl·lules Natural Killer.....	37
2. Immunitat adaptativa cel·lular.....	37
2.1. Limfòcits T CD4 ⁺	38
2.1.1. Limfòcits Th1.....	38
2.1.2. Limfòcits Th2.....	38
2.1.3. Limfòcits Th17.....	38
2.1.4. Limfòcits T reguladors (Treg).....	38
2.1.5. Limfòcits T fol·liculars.....	39
2.1.6. Limfòcits Th9.....	39
2.2. Limfòcits T CD8 ⁺	40
2.3. Limfòcits B.....	41
2.3.1. Limfòcits B1.....	41
2.3.2. Limfòcits B2.....	42
2.3.2.1. Limfòcits B de zona marginal.....	42
2.3.2.2. Limfòcits B fol·liculars.....	42
3. El sistema immunitari en el context de la mort cel·lular.....	42
3.1. Apoptosi.....	44
3.1.1. Apoptosi intrínseca.....	44
3.1.2. Apoptosi extrínseca.....	45
3.2. Piroptosi.....	46
3.3. Necroptosi.....	48
3.4. Mort cel·lular immunogènica.....	48
4. Estudi de la resposta autoimmunitària: La Diabetis Tipus 1.....	50
4.1. Pàncrees i diabetis tipus 1.....	50
4.2. Epidemiologia.....	52
4.3. Etiologia.....	53

4.3.1.	Factors genètics	53
4.3.2.	Factors ambientals	53
4.3.3.	Factors epigenètics	54
4.3.4.	Factors estocàstics	54
4.4.	Immunopatologia de la diabetis	54
4.4.1.	Mecanismes efectors: els limfòcits T	54
4.4.2.	Mecanismes efectors: els limfòcits B	55
4.5.	La diabetis tipus 1 i el sistema nerviós	56
4.6.	Model murí d'elecció per a l'estudi de la diabetis autoimmunitària: el ratolí NOD i la seva variant, el ratolí NOD.Rag2 ^{-/-}	58
5.	Estudi de la resposta antitumoral: El Càncer	59
5.1.	Respostes immunitàries enfront a tumors: Vigilància Immunològica	59
5.1.1.	Antígens tumorals	61
5.2.	Evasió de la resposta immunitària per part dels tumors	62
5.3.	Immunoteràpia contra el càncer	63
5.3.1.	Virus oncolítics	64
5.3.2.	Vacunes terapèutiques contra el càncer	64
5.3.3.	Citocines	65
5.3.4.	Teràpia cel·lular adoptiva	65
5.3.5.	Immunoteràpia amb anticossos monoclonals	66
5.3.6.	Immunoteràpia amb bloquejants de punts de control	67
5.4.	Pèptids penetrants a tumors	70
6.	Mastocitoma	72
6.1.	Model murí d'elecció de mastocitoma: Línia de mastocitoma P815 en la soca de ratolí singènica DBA/2N	73
6.1.1.	Antígen específic de tumor: P1A	73
7.	Melanoma Cutani	74
7.1.	Incidència, epidemiologia i factors de risc del melanoma	74
7.2.	Estratificació i pronòstic del melanoma cutani	75
7.3.	Tractament del melanoma cutani	76
7.4.	Model murí d'elecció de melanoma: Línia de melanoma B16-F10 en la soca de ratolí singènica C57BL/6	78
8.	Estudis previs del nostre laboratori	79
8.1.	Implicació del Sistema Nerviós en el desenvolupament de la Diabetes Tipus 1	79

8.2. Estudis sobre la Periferina com a autoantigen i com a molècula inductora de mort cel·lular i activadora de la resposta immunitària	80
HIPÒTESI I OBJECTIUS	83
1. Hipòtesi	85
2. Objectiu principal.....	85
3. Objectius específics	86
MATERIALS I MÈTODES	87
1. Ratolins	89
1.1. Estabulació i manteniment.....	89
1.2. Colònies de ratolins	89
1.3. Línies cel·lulars murines	89
2. Mostres provinents d'humans	90
2.1. Mostres de sang humana.....	90
2.2. Línies cel·lulars tumorals d'origen humà.....	90
3. Estudis d'expressió gènica.....	90
3.1. Aïllament de DRG i obtenció de sang perifèrica.....	90
3.1.1. Extracció de ARN i transcripció a ADNc	91
3.2. Realització i anàlisi de microarrays.....	91
3.3. Assaig RT-qPCR	92
3.4. Assaig ELISA.....	93
4. Citometria de flux	93
4.1. Obtenció de suspensions cel·lulars.....	93
4.1.1. Obtenció d'esplenòcits	93
4.1.2. Obtenció de monòcits provinents de medul·la òssia.....	94
4.2. Assaig Annexina V – Iodur de propí	95
4.3. Anàlisi de caspases mitjançant FLICA.....	95
4.4. Estudis de producció d'IL-2 i IFN γ	96
4.4.1. Co-cultiu d'esplenòcits amb cèl·lules tumorals	96
4.4.2. Assaig de secreció de citocines	96
4.5. Anàlisis dels resultats de citometria	97
5. Estudis <i>in vitro</i>	97
5.1. Estudis de citotoxicitat dels pèptids.....	97
6. Estudis histològics	99
6.1. Tincions per fluorescència.....	99
6.2. Criomicroscòpia electrònica.....	100

7.	Precipitació de proteïnes nuclears.....	101
7.1.	Extracció de les proteïnes nuclears.....	101
7.2.	Precipitació de la diana proteica de DIF-P	101
7.3.	Electroforesi 1D.....	102
7.4.	Tinció de plata	103
8.	Estudis <i>in vivo</i>	103
8.1.	Estudis de la funció citostàtica de DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R.....	103
8.1.1.	Injecció intratumoral dels diferents pèptids	104
8.1.2.	Injeccions endovenoses del pèptid DIF-P3K.iRGD.....	104
8.2.	Estudis de la capacitat adjuvant <i>in vivo</i> dels pèptids: Estudis de Mort Cel·lular Immunogènica	105
9.	Càlculs estadístics	107
	RESULTATS.....	109
1.	Estudi de la implicació del Sistema Nerviós en el desenvolupament de la Diabetis Tipus 1.....	111
1.1.	Estudi de les alteracions genètiques en DRG de ratolins NOD prediabètics	113
1.1.1.	Anàlisi bioinformàtic dels resultats dels microarrays	113
1.1.2.	Selecció de gens per a la confirmació mitjançant RT-qPCR.....	119
1.1.3.	Estudi de l'expressió dels gens seleccionats en cèl·lules dels DRG	120
1.2.	Estudi de les alteracions genètiques en sang perifèrica de ratolins NOD prediabètics.....	121
1.3.	Estudi de les alteracions a nivell sistèmic en mostres de sang humanes.....	122
2.	Estudi de la capacitat citotòxica i immunoestimuladora dels pèptids derivats de la Periferina	125
2.1.	Estudis <i>in vitro</i> de la capacitat citotòxica dels pèptids	127
2.1.1.	Estudi de l'efecte citotòxic dosi-dependent dels pèptids derivats de la periferina.....	128
2.1.1.1.	Cèl·lules NALM-6	128
2.1.1.2.	Esplenòcits de ratolins NOD.Rag2 ^{-/-}	130
2.1.2.	Estudi de l'efecte apoptòtic de la seqüència complementària de DIF-P.....	132
2.1.3.	Estudi de l'efecte apoptòtic d'altres filaments intermedis amb la mateixa seqüència consens	133
2.1.4.	Estudi de la importància de la seqüència aminoacídica de DIF-P	134
2.2.	Estudis sobre el mecanisme d'acció dels pèptids derivats de la periferina ...	136

2.2.1. Estudis de l'efecte dels pèptids en monòcits de medul·la òssia de ratolins C57BL/6	136
2.2.1.1. Estudis de citotoxicitat	136
2.2.1.2. Estudis d'activació de caspases	138
2.2.2. Cèl·lules MEFs WT i MEFs BAX ^{-/-} BAK ^{-/-}	140
2.2.3. Estudis histològics per localitzar el lloc d'acció dels pèptids	142
2.2.3.1. Estudis de criomicroscòpia electrònica	142
2.2.3.2. Tincions de fluorescència de les cèl·lules Hep-2	144
2.2.3.3. Tincions de fluorescència de <i>C. luciliae</i>	145
2.2.4. Anàlisi del receptor de DIF-P i DIF-P8R	147
2.3. Estudis dels efectes in vivo dels pèptids derivats de la periferina	148
2.3.1. Comprovació dels efectes in vitro dels pèptids en línies cel·lulars tumorals de ratolí	148
2.3.1.1. Inducció d'apoptosi en cèl·lules de melanoma murí: cèl·lules B16-F10	149
2.3.1.2. Inducció d'apoptosi en cèl·lules de mastocitoma murí: cèl·lules P815	151
2.3.2. Ús de DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R com a agents immunoteràpics contra el càncer	153
2.3.2.1. Melanoma B16-F10 en ratolins C57BL/6	153
2.3.2.2. Estudis IL-2/IFN	171
2.3.2.3. Mastocitoma P815 en ratolins DBA/2N	173
2.3.3. DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R com a teràpies contra el càncer	183
2.3.3.1. Tractament mitjançant injeccions intratumorals dels pèptids	183
2.3.3.2. Tractament mitjançant la injecció dels pèptids a nivell sistèmic	185
DISCUSSIÓ	189
1. Estudi de la implicació del Sistema Nerviós en el desenvolupament de la Diabetis Tipus 1	191
2. Estudi de la capacitat citotòxica i immunoestimuladora dels pèptids derivats de la Periferina	197
CONCLUSIONS	209
ANNEX	215
BIBLIOGRAFIA	235
ARTICLES RELACIONATS	257

RESUMS

Estudis de la Resposta Immunitària en els contextos d'Autoimmunitat i Immunitat

Tumoral: models de Diabetis Tipus 1 i Melanoma Cutani

La funció del sistema immunitari és eliminar qualsevol agent infecciós o cèl·lula danyada, propocionant una protecció a llarg termini contra aquests. A més a més, disposa de diferents mecanismes de selecció i tolerància per tal de controlar als limfòcits autoreactius. Defectes en la regulació d'aquests mecanismes poden donar lloc a l'aparició de malalties autoimmunitàries com la Diabetis Tipus 1 (T1D), la qual es caracteritza per la destrucció selectiva de les cèl·lules β pancreàtiques. Malgrat aquestes són la principal diana de l'atac autoimmunitari, no són la única. Alteracions en les neurones sensorials aferents que innerven el pàncrees i que tenen els seus cossos cel·lulars als ganglis dorsals raquidis (DRG), s'han relacionat amb el desenvolupament de la T1D. En el present treball, es va realitzar un anàlisi de l'expressió de ARNm en cèl·lules dels DRG que demostra la presència d'alteracions funcionals en aquest tipus cel·lular, avalant la hipòtesi que la T1D és una malaltia multisistèmica i que, entre el conjunt de cèl·lules afectades per l'atac autoimmunitari, s'hi podrien trobar també les cèl·lules dels DRG. Aquestes presenten un conjunt d'alteracions en l'expressió de diverses proteïnes que podrien generar una resposta autoimmunitària contra autoantígens tant del Sistema Nerviós Perifèric com de les cèl·lules β . Algunes d'aquestes alteracions es van veure també en leucòcits de sang perifèrica, esdevenint possibles biomarcadors de susceptibilitat a desenvolupar T1D. Tot i així, caldria fer més estudis per tal de comprendre el paper d'aquesta neurodegeneració en el desenvolupament de la T1D així com per determinar quin o quins gens podrien ser bons biomarcadors per a detectar pacients susceptibles a desenvolupar T1D.

Paral·lelament als estudis de les cèl·lules dels DRG, en el transcurs de l'estudi del paper de la periferina com a autoantigen en la T1D, es va veure que un dels pèptids derivats d'aquesta molècula (DIF-P) estimulava la producció de citocines proinflamàtores per part dels monòcits i induïa la mort de diversos tipus cel·lulars. A més a més, aquestes propietats funcionals es trobaven alterades quan es modificava el pèptid amb una cua de 3 lisines (DIF-P3K) o de 8 arginines (DIF-P8R), probablement degut a que aquestes cues d'aminoàcids els converteixen en pèptids penetrants cel·lulars (CPPs) que permeten la seva millor internalització. Donades les propietats citotòxiques i immunoestimuladores de DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R, es va decidir fer un salt als estudis *in vivo* per tal d'estudiar el seu potencial com a agents immunoterapèutics contra el càncer. Els diversos estudis *in vivo* realitzats fins al moment demostren l'activitat antitumoral dels pèptids DIF en els models

de melanoma i mastocitoma, indicant el seu ús potencial en el tractament de càncer humà, ja sigui com a agents citostàtics i/o immunoterapèutics, i d'aquesta manera passar a formar part de l'arsenal terapèutic d'aquesta malaltia.

Estudios de la Respuesta Inmunitaria en los contextos de Autoinmunidad e Inmunidad Tumoral: modelos de Diabetes Tipo 1 y Melanoma Cutáneo

La función del sistema inmunitario es eliminar cualquier agente infeccioso o célula dañada, proporcionando una protección a largo plazo contra estos. Además, dispone de diferentes mecanismos de selección y tolerancia para controlar a los linfocitos autorreactivos. Defectos en la regulación de estos mecanismos pueden dar lugar a la aparición de enfermedades autoinmunes como la Diabetes Tipo 1 (T1D), que se caracteriza por la destrucción selectiva de las células β pancreáticas. A pesar de que éstas son la principal diana del ataque autoinmunitario, no son la única. Alteraciones en las neuronas sensoriales aferentes que inervan el páncreas y que tienen sus cuerpos celulares en los ganglios dorsales raquídeos (DRG), se han relacionado con el desarrollo de la T1D. En el presente trabajo, se realizó un análisis de la expresión de ARNm en células de los DRG que demuestra la presencia de alteraciones funcionales en este tipo celular, avalando la hipótesis de que la T1D es una enfermedad multisistémica y que, entre el conjunto de células afectadas por el ataque autoinmunitario, se podrían encontrar también las células de los DRG. Estas presentan un conjunto de alteraciones en la expresión de varias proteínas que podrían generar una respuesta autoinmune contra autoantígenos tanto del Sistema Nervioso Periférico como de las células β . Algunas de estas alteraciones se observaron también en leucocitos de sangre periférica, convirtiéndose en posibles biomarcadores de susceptibilidad a desarrollar T1D. Sin embargo, habría que hacer más estudios para comprender el papel de esta neurodegeneración en el desarrollo de la T1D así como para determinar qué genes podrían ser buenos biomarcadores para detectar pacientes susceptibles a desarrollar T1D.

Paralelamente a los estudios de las células de los DRG, en el transcurso del estudio del papel de la periferina como autoantígeno en la T1D, se vió que uno de los péptidos derivados de esta molécula (DIF-P) estimulaba la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de los monocitos e inducía la muerte de distintos tipos celulares. Además, estas propiedades funcionales estaban alteradas cuando se modificaba el péptido con una cola de 3 lisinas (DIF-P3K) o de 8 argininas (DIF-P8R), probablemente debido a que estas colas de aminoácidos los convertían en péptidos penetrantes celulares (CPPs) y permitían su mejor internalización. Dadas las propiedades citotóxicas y inmunoestimuladoras de DIF-P, DIF-P3K y DIF-P8R, se decidió dar un salto a los estudios *in vivo* para estudiar su potencial como agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer. Los

diferentes estudios *in vivo* realizados hasta el momento demuestran la actividad antitumoral de los péptidos DIF en los modelos de melanoma y mastocitoma, indicando su uso potencial en el tratamiento de cáncer humano, ya sea como agentes citostáticos y/o inmunoterapéuticos, y de este modo pasar a formar parte del arsenal terapéutico de esta enfermedad.

Studies of the Immune Response in the Contexts of Autoimmunity and Tumor Immunity: Models of Type 1 Diabetes and Cutaneous Melanoma

The main function of the immune system is to eliminate any infectious agents or damaged cells, providing long-term protection against them. Moreover, it has different selection and tolerance mechanisms in order to control self-reactive lymphocytes. Defects in the regulation of these mechanisms can lead to the onset of autoimmune diseases such as Type 1 Diabetes (T1D), which is characterized by the selective destruction of pancreatic β cells. Although these cells are the main target of the autoimmune attack, they are not the only one. Alterations in the afferent sensory neurons innervating the pancreas and having their cell bodies in the Dorsal Root Ganglia (DRG) have been linked to T1D development. In the present study, we performed an analysis of mRNA expression in DRG that demonstrates the presence of functional alterations in this cell type, supporting the hypothesis that T1D is a multisystemic disease and that DRG cells can be found among the set of cells affected by the autoimmune attack. These cells present a set of alterations in the expression of various proteins that could generate an autoimmune response against autoantigens of both the Peripheral Nervous System and β cells. Some of these alterations were also found in peripheral blood leukocytes, suggesting their possible role as biomarkers of susceptibility to develop T1D. However, further studies are needed to better understand the role of this neurodegeneration in the development of T1D as well as to determine which genes could be good biomarkers for detecting patients susceptible to develop T1D.

In parallel with the DRG cells studies, in the course of the study of the role of peripherin as an autoantigen in T1D, it was seen that one of the peptides derived from this molecule (DIF-P) stimulated the production of proinflammatory cytokines by monocytes as well as inducing the death of various cell types. In addition, these functional properties were altered when the peptide was modified with a 3-lysine (DIF-P3K) or 8-arginine (DIF-P8R) tail, probably because these amino acid tails turn them into Cell Penetrating Peptides (CPPs) allowing for better internalization. Given the cytotoxic and immunostimulatory properties of DIF-P, DIF-P3K, and DIF-P8R, it was decided to make a leap into *in vivo* studies to study their potential as immunotherapeutic agents against cancer. The different *in vivo* studies performed so far demonstrate the antitumor activity of DIF peptides in the models of melanoma and mastocytoma, indicating their potential use in the treatment of human cancer, either as cytostatic and/or immunotherapeutic agents, and this way become part of the therapeutic arsenal of this disease.

ABREVIACIONES

A

ACD: *Accidental Cell Death*

ACT: *Adoptive cell therapy*

ANXA1: Annexina A1

APAF: *Apoptotic Peptidase Activating Factor*

APC: Cèl·lula Presentadora d'Antigen

ATP: Adenosina Trifosfat

B

BAFF: *B-Cell Activating Factor*

BCR: *B Cell Receptor*

C

CALR: Calreticulina

CAR-T: *Chimeric Antigen Receptor T Cells*

CCR: *C-C chemokine receptor*

CD: *Cluster of Differentiation*

cDCs: Cèl·lules dendrítiques clàssiques

CEA: Antigen carcinoembrionari

CGA: *Cancer-Germinal Antigens*

CGRP: *Calcitonin-Gene Related Peptide*

CPP: *Cell Penetrating Peptide*

CTL: *Cytotoxic T Lymphocyte*

CTLA-4: *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*

D

DAMP: *Damage Associated Molecular Pattern*

DCs: Cèl·lules dendrítiques

DISC: *Death Inducing Signalling Complex*

DMSO: Dimetilsulfòxid

DRG: *Dorsal Root Ganglia*, o Ganglis Dorsals Raquidis

dsDNA: *Double-stranded DNA*

E

EDTA: Àcid etilendiaminotetraacètic

F

FADD: *Fas-Associated Death Domain*

FAS: *Fas Cell Surface death receptor*

FBS: Sèrum Fetal Boví

FDA: *U.S. Food and Drug Administration*

FI: Filament intermedi

G

GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*

GM-CSF: *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*

Gp100: glicoproteïna 100

GSDMD: Gasdermina D

H

HLA: *Human Leucocyte Antigen*, o Antigen Leucocitari Humà

HMGB1: *High-Mobility Group Box 1*

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

I

ICD: *Immunogenic Cell Death* o Mort Cel·lular Immunogènica

Idd: *Insulin Dependent Diabetes*

IDDM: *Insulin Dependent Diabetes Mellitus*

IFN: Interferó

Ig: Immunoglobulina

IgH: Cadena pesada de la immunoglobulina

IgL: Cadena lleugera de la immunoglobulina

IKDC: *Interferon-producing Killer Dendritic Cells*

IL: Interleuquina

IP: Iodur de propí

L

LPS: Lipopolisacàrid

M

MAGE-1: *Melanoma Associated Antigen 1*

MCC: Medi de cultiu complert

MDA: *Melanocyte Differentiation Antigens*, o Antigenes de Diferenciació de Melanoòcits

MDSC: *Myeloid-Derived Suppressor Cells*

Melan-A: Antigen dels melanòcits

MHC: Molècules d'Histocompatibilitat

MLKL: *Mixed Lineage Kinase-Like*

MOMP: *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*

N

NK: *Cèl·lules Natural Killer*

NKDC: *Natural Killer Dendritic Cell*

NLRP: *NOD-like receptor. Pyrin domain containing*

NOD: *Non-Obese Diabetic mouse*

O

OLS: Òrgan Limfoide Secundari

P

PAMP: *Pathogen Associated Molecular Pattern*

PBS: Tampó fosfat salí

PCR: Reacció en cadena de la Polimerasa

PD-1: *Programmed Death 1*

PDGF: *Platelet Derived Growth Factor*

PD-L1: *Programmed Death Ligand 1*

pDC: Cèl·lules dendrítiques plasmacitoides

PFA: Paraformaldehid

PRPH: Periferina

PRR: *Pattern recognition receptor*

pSC: *peri-islet Scwann Cells*

PYD: *N-terminal pyrin domain*

R

RAG2: *Recombination activating genes-2*

RCD: *Regulated Cell Death*

RIPK: *Receptor Interacting Protein Domain*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

S

SNP: Sistema Nerviós Perifèric

Sp: Substància P

SPF: *Specific Pathogen Free*

T

T1D: *Type 1 Diabetes*, Diabetis tipus 1

TAA: *Tumor-Associated Antigen*

TAM: *Tumor-Associated Macrophage*

TAN: *Tumor-Associated Neutrophil*

TCR: *T Cell Receptor*

T_{FH}: Limfòcit T fol·licular

TGF: *Transforming Growth Factor*

Th: *T Helper*

TLR: *Toll-like receptor*

TME: *Tumor microenvironment*

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

TNFR1: *TNF Receptor Superfamily member 1*

TNM: *Tumor-Node-Metastasis*

TPP: *Tumor-Penetrating Peptide*

TRA: Antígens restringits de teixit

TRADD: *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*

Treg: Limfòcit T regulador

TRPV1: *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*

TSA: *Tumor-Specific Antigen*

V

Vcp: *Valosin Containing Protein*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

INTRODUCCIÓ

La funció del sistema immunitari és la d'actuar com un sistema integrat de defensa amb la responsabilitat de controlar i eliminar qualsevol agent infecció i proporcionar una protecció a llarg termini contra aquests. A banda d'actuar enfront amenaces externes, el sistema immunitari també fa front a amenaces internes, com per exemple, tumors.

La resposta immunitària enfront a un patògen i, també, enfront dany a les pròpies cèl·lules es pot dividir en dues fases: una primera resposta innata seguida per una resposta adaptativa. Quan l'organisme està exposat a un dany, ja sigui extern o intern, les cèl·lules de la resposta immunitària innata (cèl·lules dendrítiques, macròfags, monòcits o neutròfils) són capaces de reconèixer els patrons específics de patògens (PAMPs, de l'anglès *Pathogen Associated Molecular Patterns*) o de senyals de perill (DAMPs, de l'anglès *Danger Associated Molecular Patterns*) a través dels receptors PRR o *Pattern Recognition Receptors*. Aquests receptors de la immunitat innata inicien una sèrie de mecanismes adreçats a eliminar el causant de la senyal d'alerta. La resposta innata, però, no genera memòria. És necessària l'activació de la resposta adaptativa i, per tant, dels seus actors principals, els limfòcits T i B, per tal de generar memòria enfront posteriors exposicions al dany en qüestió. Els limfòcits B fol·liculars necessiten de la presència dels limfòcits T per a activar-se, resultant en una resposta d'alta afinitat enfront el patògen o la cèl·lula cancerosa.

1. Immunitat innata cel·lular

Les respostes immunitàries innates es donen amb molta rapidesa en el moment de l'exposició a un microorganisme infecció o al dany cel·lular. Les primeres cèl·lules en respondre-hi són les cèl·lules del sistema immunitari innat, descrites a continuació.

1.1. Monòcits i Macròfags

Els monòcits són cèl·lules d'origen mieloide que circulen en sang i migren de forma continua cap als diferents teixits, on es diferencien en macròfags. Aquests responen a estímuls ambientals dins de teixits com cèl·lules danyades, limfòcits activats o productes microbians, per tal de diferenciar-se en dos fenotips funcionals diferents: els macròfags M1 i els macròfags M2¹.

La presència de lipopolisacàrids (LPS), interferó γ (IFN- γ) i GM-CSF (de l'anglès, *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) fa que els macròfags es polaritzin cap al fenotip M1. Aquests, es caracteritzen per la secreció de grans quantitats de citocines com interleucina 1 β (IL-1 β), TNF (de l'anglès, *Tumor Necrosis Factor*), IL-12, IL-18 i IL-

23, la qual cosa ajuda a impulsar respostes inflamatòries de tipus Th1 i Th17 específiques d'antigen. Fenotípicament, els macròfags M1 expressen alts nivells de molècules d'histocompatibilitat (MHC) de tipus II, CD68 i les molècules coestimuladores CD80 i CD86² (Taula 1). En canvi, els macròfags M2 es caracteritzen per la seva participació en el control de paràsits, la remodelació de teixits, la regulació immunitària, la promoció del tumor i l'activitat fagocítica eficient. La terminologia M2 engloba un grup funcionalment divers de macròfags que es divideix en els subconjunts M2a, M2b, M2c i M2d, segons els seus diferents perfils d'expressió gènica^{1,3} (Taula 1).

Recentment s'ha demostrat que, *in vitro*, els macròfags són capaços de repolaritzar-se completament de M2 a M1 i poden invertir la seva polarització ràpidament en funció de l'entorn de quimiocines⁴.

Taula 1. Fenotip dels diferents subconjunts de macròfags^{1,3}.

	Estímul d'activació	Marcadors d'expressió	Citocines secretades	Quimiocines secretades
M1	IFN γ LPS GM-CSF	CD86 TLR2 CD80 TLR4 CD68 iNOS MHC-II SOCS3 IL-1R	TNF IL-1 β IL-6 IL-12 IL-23	CCL10 CCL2 CCL11 CCL3 CCL5 CCL4 CCL8 CCL9
M2a	IL-4 IL-13 Infecció per fongs o helmints	CD163 <i>En ratolins:</i> MHC-II <i>Ym1/2</i> SR <i>Fizz1</i> CD206 <i>Arg-1</i> CD200R TGM2 DecoyR IL-1R II	IL-10 TGF- β IL-1ra	CCL17 CCL22 CCL24
M2b	ICs IL-1R	CD86 MHC-II	IL-1 IL-10 IL-6 TNF- α	CCL1
M2c	IL-10 TGF- β GCs	CD163 TLR1 TLR8	IL-10 TGF- β	CCR2
M2d	IL-6 LIF Adenosina	VEGF	IL-10 TNF- α IL-12 TGF- β	CCL5 CXCL10 CXCL16

Arg-1, *Arginase-1*; FIZZ1, *resistin-like molecule-alpha* (Relm-alpha); GCs, glucocorticoides; ICs, immunocomplexos; IL1-ra, *IL-1 receptor antagonist*; LIF, *leukocyte inhibitory factor*; TGM2, *transglutaminase 2*; TGF- β , *transforming growth factor β* ; TNF- α , *tumor necrosis factor α* ; TLR, *Toll-like receptor*; MMR (CD206), *macrophage mannose receptor*; iNOS, *inducible nitric oxide synthase*; SR, *scavenger receptor*; SOCS3, *suppressor of cytokine signalling 3*; VEGF, *vascular endothelial growth factor*; Ym1 (també conegut com a *chitinase-3-like protein-3* (Chi3l3)).

1.2. Granulòcits

Els granulòcits o leucòcits polimorfonuclears són cèl·lules d'origen mieloide amb una morfologia característica que els defineix: grans grànuls citoplasmàtics i un nucli bilobulat. En comparació amb els macròfags, són de vida relativament breu i es produeixen de manera augmentada durant les respostes immunitàries per migrar al lloc de l'estrès. Allà alliberen un gran nombre de molècules efectores, com histamina, citocines, quimiocines, enzims i factors de creixement, generant inflamació en el lloc de l'estrès. Es divideixen en quatre tipus: neutròfils, basòfils, eosinòfils i mastòcits.

Els **neutròfils** són els més nombrosos i els de major importància en les respostes immunitàries innates. Utilitzant una sèrie de receptors de la superfície cel·lular, el neutròfil és capaç de viatjar fins al teixit mitjançant quimiotaxi, seguint gradients de concentració de quimiocines i/o molècules derivades de patògens fins al lloc de la lesió⁵. L'exposició a nivells elevats de totes aquestes molècules promou l'activació de neutròfils⁶, els quals ataquen els microbis i/o cèl·lules danyades mitjançant diversos mecanismes: fagocitosi, desgranulació i/o NETosi⁷.

Els **eosinòfils** constitueixen aproximadament l'1% dels leucòcits circulants, augmentant fins al 3-5% quan s'activen. Un cop madurs, deixen la medul·la òssia, circulen per la sang i migren cap als teixits en els llocs d'infecció/inflamació. És allà on són activats per molècules efectores, incloent IL-3, IL-5 i GM-CSF. Els eosinòfils tenen un paper important i variat en la resposta immunitària, i poden activar tant la resposta innata com l'adaptativa. En aquests darrers anys s'ha demostrat que els eosinòfils estimulen les cèl·lules T i ajuden a la supervivència a llarg termini de les cèl·lules plasmàtiques (a causa de la producció del factor de supervivència de les cèl·lules plasmàtiques APRIL) a la medul·la òssia i a la làmina pròpia^{8,9}. Ho fan mitjançant la producció i alliberament de moltes molècules efectores diferents, com grànuls catiónics (alliberats per desgranulació)⁹; citocines, com per exemple IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α i GM-CSF¹⁰; factors de creixement, com TGF- β (de l'anglès, *Tumor Growth Factor β*), VEGF (de l'anglès, *Vascular Endothelial Growth Factor*) i PDGF (de l'anglès, *Platelet Derived Growth Factor*)¹¹; enzims o mediadors lipídics, com els eicosanoides¹².

Els **basòfils** representen menys de l'1% dels leucòcits en circulació i rarament es troben en els teixits perifèrics, però es creu que tenen un paper central en les respostes immunes induïdes per al·lèrgens i helmints. Un cop activats, alliberen la histamina continguda en els

seus grànuls citoplasmàtics. Participen en la defensa de l'hoste contra les infeccions parasitàries i, recentment, s'ha suggerit que també tindrien la capacitat de modular les funcions de les cèl·lules B.

Els **mastòcits** són leucòcits derivats de la medul·la òssia que participen en la defensa de l'hoste contra els patògens i en la promoció de la cicatrització de les ferides. S'alliberen a la circulació com a cèl·lules immadures i migren cap als teixits perifèrics on es diferencien en mastòcits madurs. Es troben principalment en teixits que interactuen amb l'entorn extern, inclosa la pell, el pulmó i el tracte gastrointestinal. Els mastòcits madurs tenen una vida mitjana llarga. S'activen en presència d'anafilotoxines com C3a i C5a, i quan un antigen s'uneix al complex IgE/FcεRI present a la superfície dels mastòcits, la qual cosa provoca una cascada de senyalització que finalitza amb l'alliberament del contingut dels grànuls dels mastòcits, com serina proteasa, histamina, serotonina, heparina, eicosanoides i citocines¹³.

1.3. Cèl·lules dendrítiques

Les cèl·lules dendrítiques o DCs (de l'anglès, *Dendritic Cells*) són un grup divers de cèl·lules des dels punts de vista funcional, fenotípic i de desenvolupament. A banda d'actuar com a cèl·lules presentadores d'antigen o APCs (de l'anglès, *Antigen Presenting Cells*) per als limfòcits T, activant així una resposta immunitària adaptativa, les DCs també són capaces d'iniciar una resposta immunitària innata i, fins i tot, tenen un paper en la tolerància immunitària^{14,15}.

Es classifiquen en dos subconjunts: les DCs clàssiques (cDCs) i les plasmacitoides (pDCs). Les cDCs es troben en llocs de possible contacte amb microorganismes, com l'intestí, la pell o els pulmons. Les cDCs immadures capturen i processen els antígens i transiten d'aquests teixits cap als òrgans limfoides secundaris (OLS), on maduren i presenten l'antigen als limfòcits en el context del MHC de tipus II¹⁶. Les pDCs, en canvi, es troben en òrgans perifèrics del sistema limfàtic en estat estacionari. La seva funció és respondre a infeccions víriques mitjançant la secreció de IFN-α/β1. No obstant, també poden participar en l'activació i control de les respostes de limfòcits T¹⁶.

Fins ara, no s'ha descrit cap marcador exclusiu de DCs i, per d'identificar-les, s'utilitza una combinació de la presència de marcadors de DCs (taula 2) i l'absència de marcadors de llinatge, com ara CD3 (cèl·lula T), CD14 (monòcit), CD19 (cèl·lula B), CD56 (cèl·lula NK) i CD66b (granulòcit).

Taula 2. Marcadors de cDCs i pDCs, humanes i murines^{14,16-18}.

cDCs humanes		cDCs murines		pDCs humanes		pDCs murines	
BDCA-1	CD11c	Btla	CD117	BDCA-2	CD123	Bst2	MHC-II ^{low}
CD8	CD103	CD11b	CD135	BDCA-2	ILT-7	CD11c ^{low}	TLR7
CD8a	CD205	CD11c	Flt3	CD11c ^{low}	MHC-II ^{low}	Ly-6C	TLR9
CD11b	MHC-II	CD24	MHC-II	CD45RA/ B220	TLR7 TLR9	Ly-49Q	

1.4. Cèl·lules Natural Killer

Les cèl·lules *Natural Killer* o NK són cèl·lules d'origen limfoide que tenen la capacitat de reconèixer i eliminar algunes cèl·lules anormals, com per exemple, cèl·lules tumorals i cèl·lules infectades pel virus de l'herpes. Les cèl·lules NK no expressen un receptor específic de l'antigen (BCR – *B Cell Receptor* – o TCR – *T Cell Receptor*) i tradicionalment formen part del sistema immunitari innat. El seu efecte és independent de l'antigen i, en general, no dóna lloc a memòria immunològica ni immunitat protectora a llarg termini, malgrat que en els últims anys es postula l'existència d'una certa “memòria” NK¹⁹. Per tal d'eliminar les cèl·lules diana, alliberen grànuls citotòxics cap a la superfície d'aquesta. Les proteïnes efectores que contenen penetren la membrana cel·lular i indueixen una mort cel·lular programada.

En ratolins, les cèl·lules NK es defineixen com a cèl·lules CD3⁻ NK1.1⁺²⁰. Normalment, també expressen CD49b, CD11b, CD27, T-bet i Eomes, i no tenen expressió de CD127/IL-7RA. S'han caracteritzat tres subconjunts de cèl·lules NK de ratolí basades en l'expressió diferencial de CD11b i CD27. Aquests inclouen cèl·lules NK CD11b^{low}CD27^{high}, cèl·lules NK CD11b^{high}CD27^{low}²¹ i cèl·lules NK CD11b^{high}CD27^{high}²¹. S'ha trobat que les cèl·lules NK CD27^{low} tenen un potencial citotòxic inferior i produeixen nivells més baixos de citocines que les cèl·lules NK CD27^{high}.

2. Immunitat adaptativa cel·lular

Mentre que el sistema immunitari innat només pot reconèixer un nombre limitat de PAMPs i DAMPs, el sistema immunitari adaptatiu dóna lloc a una resposta específica enfront una gran varietat d'antígens, contra els quals genera memòria de cara a posteriors exposicions al dany en qüestió. Per a l'acció de la resposta adaptativa, és necessària l'activació dels seus actors principals, els limfòcits T i B. Una vegada superats tots els mecanismes de tolerància necessaris per evitar el reconeixement d'antígens propis, els limfòcits es diferencien en diverses subpoblacions en funció de les interaccions amb les cèl·lules circumdants, de les

citocines de l'entorn i del tipus d'antigen que reconeixen. A continuació es descriuen les principals poblacions de limfòcits T i B.

2.1. Limfòcits T CD4⁺

Els limfòcits T CD4⁺ o T *helper* (Th) es poden diferenciar en diverses subpoblacions en funció de les senyals rebudes a través del TCR, les molècules coestimuladores i les citocines presents al microambient (figura 1). A continuació, es recullen els tipus de Th més comuns.

2.1.1. Limfòcits Th1

Els limfòcits Th1 adquireixen el seu fenotip quan en el microambient hi ha IL-12²². La seva funció principal és eliminar bacteris intracel·lulars. En aquest context són capaços de secretar IFN- γ i expressar el factor de transcripció T-Bet²³. En condicions no fisiològiques, s'han relacionat amb moltes malalties autoimmunitàries com, per exemple, la diabetis tipus 1 (T1D, de l'anglès *Type 1 Diabetes*)^{24,25}.

2.1.2. Limfòcits Th2

Els limfòcits Th2 adquireixen el seu fenotip en presència de IL-4, essent també la principal citocina que secreten. La seva producció fa que els limfòcits B canviïn el seu isotip de IgG1 a IgE i és per això que es relacionen amb al·lèrgies²⁴. La funció principal dels limfòcits Th2 és la d'eliminar paràsits del nostre cos i el factor de transcripció que expressen és GATA3^{24,25}.

2.1.3. Limfòcits Th17

Els limfòcits Th17 expressen el factor de transcripció ROR γ T i produeixen grans quantitats de IL-17A²⁶, la qual atrau als neutròfils al focus de la infecció^{27,28}. La funció principal dels Th17 és protegir a l'organisme d'infeccions de bacteris gram-negatius i infeccions per fongs^{28,29}. La seva diferenciació requereix de la presència conjunta en el medi de les citocines IL-6 i TGF- β ³⁰.

2.1.4. Limfòcits T reguladors (Treg)

En funció del lloc on es desenvolupen, podem distingir dos tipus de limfòcits T reguladors. Els T reguladors naturals o nTreg es formen al timus com a mètode de control dels limfòcits T autoreactius. Per a la seva diferenciació és necessària l'expressió de IL-2 al timus³¹. Sobre-expressen el factor de transcripció Foxp3, la qual cosa és una característica excloent en ratolins. En humans, però, la seva expressió s'ha relacionat amb l'activació de limfòcits

en general³², sent necessària l'expressió de molècules com la CD25 per a diferenciar-se d'altres Th. Els limfòcits T reguladors generats a la perifèria reben el nom de iTreg, o limfòcits T reguladors induïts, i es diferencien en dues poblacions: els Tr1 i els Th3^{31,33}. Els limfòcits Treg controlen la funció dels limfòcits T efectors a través de l'expressió de molècules inhibidores així com mitjançant la producció d'elevades quantitats de citocines anti-inflamatòries com la IL-10, el TGF- β o una combinació d'ambdues³⁴. Per a la diferenciació dels iTreg a la perifèria és necessària la presència de TGF- β juntament amb l'estímul via TCR del autoantigen presentat en el context de MHC²⁴.

2.1.5. Limfòcits T fol·liculars

Els limfòcits T fol·liculars o T_{FH} es troben dins els fol·licles dels OLS, juntament amb els limfòcits B³⁵. Igual que els limfòcits Th2, els T_{FH} són essencials en la resposta humoral. Participen en la selecció d'aquells limfòcits B no autoreactius sotmesos a hipermutació somàtica³⁶. Es caracteritzen per l'expressió del factor de transcripció BCL6³⁵ i produeixen una elevada varietat de citocines³⁷. També expressen altes quantitats en membrana de ICOS (de l'anglès, *Inducible CoEstimulator*), CXCR5 i PD-1 (de l'anglès *Programmed Cell Death 1*), els quals són necessaris per a poder interaccionar amb els limfòcits B^{38,39}.

2.1.6. Limfòcits Th9

Els limfòcits T necessiten la presència de TGF- β i IL-4 per tal de diferenciar-se en Th9^{40,41}. Expressen el factor de transcripció PU.1⁴² i produeixen la IL-9, que estimula la formació del moc en les vies respiratòries. És per això que els limfòcits Th9 tenen una gran rellevància en pacients asmàtics⁴³.

És necessari remarcar que el fenotip adquirit pels limfòcits T CD4⁺ no és permanent i que pot variar si es fomenta un microentorn adequat per al canvi. És a dir, si un limfòcit Th1 es troba en un ambient on s'afavoreix la diferenciació a Th2, és capaç d'adquirir les característiques d'aquesta població i diferenciar-s'hi. A més a més, s'ha demostrat que poden compartir característiques de dos tipus de Th al mateix temps, de manera que un limfòcit Th podria ser Th1/Th17 i produir alhora IFN- γ i IL-17A^{22,25,38,39}. Aquesta capacitat podria ser d'utilitat en la resposta a alguns patògens, ja que el limfòcit T seria capaç d'actuar com a Th17 mentre el bacteri es troba en zona extracel·lular i, seguidament, diferenciar-se en Th1 per atacar aquells bacteris que han envaït alguna cèl·lula⁴⁴.

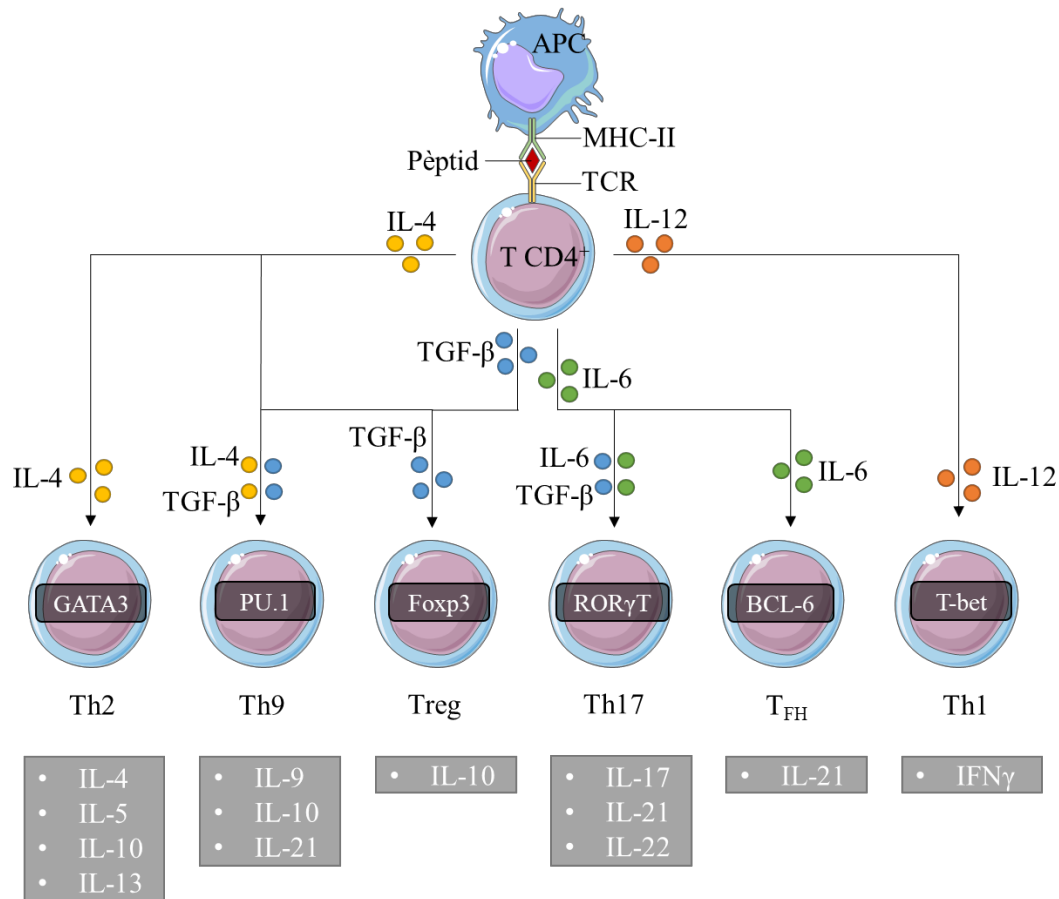


Figura 1. Poblacions majoritàries de limfòcits Th que es poden generar a partir d'un limfòcit CD4⁺ naive en funció de les citocines presents en l'ambient, la secreció de citocines per cada tipus i els factors de transcripció expressat. Adaptat de l'article Kaplan et. al. (2015), de *Nature Reviews Immunology*⁴⁵.

2.2. Limfòcits T CD8⁺

Els limfòcits T CD8⁺ o CTLs (de l'anglès, *Cytotoxic T Lymphocytes*) són una subpoblació de cèl·lules T generada al timus que participa en la immunitat adaptativa. De la mateixa manera que els limfòcits T CD4⁺, els CTLs expressen el receptor de les cèl·lules T o TCR. No obstant, en lloc de la molècula CD4, expressen el co-receptor dimèric CD8.

El paper de les cèl·lules T CD8⁺ és supervisar i destruir qualsevol cosa que es consideri una amenaça per a la integritat de l'hoste com, per exemple, infeccions víriques i bacterianes intracel·lulars. D'altra banda, també es creu que els CTLs proporcionen algun grau de protecció contra els tumors malignes espontanis, gràcies a la seva capacitat per detectar diferències antigèniques quantitatives i qualitatives en cèl·lules transformades⁴⁶. Les cèl·lules T CD8⁺ reconeixen un antigen presentat en el context del MHC de classe I.

Quan el CTL reconeix el seu antígen i s'activa, té tres mecanismes principals per matar cèl·lules infectades o malignes⁴⁶:

1. Mitjançant la secreció de citocines, principalment TNF- α i IFN- γ . El TNF- α s'uneix al seu receptor en la cèl·lula diana i promou en aquesta l'activació d'una cascada de caspases que, finalment, dona lloc a la mort per apoptosi de la cèl·lula diana. El IFN- γ , en canvi, indueix l'activació transcripcional de la via de presentació d'antígens de classe MHC-I i Fas a les cèl·lules diana, fet que condueix a la presentació millorada de pèptids endògens per MHC de classe I, i augmenta la lisi de cèl·lules diana mediada per Fas.
2. Mitjançant l'expressió de FasL en la superfície del CTL. Aquest s'uneix a Fas, expressat en la cèl·lula diana, la qual cosa desencadena l'activació de la cadena de caspases i, conseqüentment, la mort per apoptosi de la cèl·lula diana.
3. Mitjançant l'alliberament a l'espai intracel·lular dels grànuls citotòxics, els quals contenen dues famílies de proteïnes: perforina i granzims. Aquestes proteïnes citotòxiques són captades per la cèl·lula diana, provocant la mort d'aquestes de manera tant dependent com independent de caspases.

2.3. *Limfòcits B*

Segons el seu origen, es poden distingir 2 grups de limfòcits B: els limfòcits B1, generats a partir d'un progenitor fetal, i els limfòcits B2, formats a la medul·la òssia. Aquests últims es diferencien, al seu torn, en limfòcits B de zona marginal i limfòcits B de zona fol·licular en funció de la seva localització, la seva habilitat per migrar i per la manera en que s'activen, T-dependent o T-independent⁴⁷.

2.3.1. *Limfòcits B1*

Es poden distingir 2 tipus de limfòcits B1 depenent de la seva funció: els B1a (IgM^{high}CD43⁺CD5⁺), que s'encarreguen de produir anticossos naturals amb un ampli espectre com a primera barrera enfront una infecció, i els B1b (IgM^{high}CD43⁺CD5⁻), que comparteixen diverses característiques amb els limfòcits B de zona marginal, com la activació T-independent i la ràpida producció d'anticossos IgM o IgG de baixa afinitat⁴⁷⁻⁴⁹. Es troben en la zona peritoneal, la cavitat pleural i la melsa⁵⁰. La principal actuació dels limfòcits B1 és durant la resposta de la immunitat innata a través de la producció d'anticossos naturals.

2.3.2. *Limfòcits B2*

Els limfòcits B2 passen per dos estats transitoris abans de diferenciar-se en limfòcits B fol·liculars o limfòcits B de zona marginal. Quan arriben a la melsa passen a anomenar-se limfòcits B transicionals de tipus 1 (T1) i són testats enfront a antígens propis per tal d'eliminar aquells que els reconeixen amb una alta afinitat. Si no és així, es converteixen en limfòcits B transicionals de tipus 2 (T2)^{48,51}.

2.3.2.1. *Limfòcits B de zona marginal*

Els limfòcits B de zona marginal (IgM^{high}IgD^{low}CD21^{high}CD23^{low}) es troben a la zona fronterera entre la polpa blanca i la polpa vermella de la melsa. La seva localització fa que siguin unes de les primeres cèl·lules en entrar en contacte amb els antígens provinents de la sang⁴⁹. Tenen una ràpida capacitat d'activació i poden respondre enfront antígens lipídics a través de la molècula CD1d i ajuden a transportar als immunocomplexes amb antígens d'interès fins als fol·licles⁴⁷. A més a més, gràcies a l'elevada expressió de molècules MHC de classe II i de molècules B-7 (CD80 i CD86) a la seva membrana, poden activar per si mateixos als limfòcits T CD4⁺⁵². El seu BCR reconeix diversos antígens amb un mateix anticòs, la qual cosa els fa essencials en la resposta innata i en la producció d'anticossos neutralitzants polireactius^{50,53}. Al diferència dels limfòcits B fol·liculars, els limfòcits B de zona marginal responen de manera molt eficaç a les senyalitzacions via TLR (de l'anglès, *Toll-like Receptor*), la qual cosa permet que s'activin de forma T-independent⁵⁴.

2.3.2.2. *Limfòcits B fol·liculars*

Els limfòcits B fol·liculars (IgM^{med}IgD^{high}CD21^{med}CD23^{high})⁵⁵ són essencials en la resposta humoral contra patògens. Al formar part del sistema immunitari adaptatiu, necessiten diversos dies per a poder generar anticossos d'alta afinitat contra el patògen⁵⁶. Interaccionen amb els antígens que reconeixen als OLS com són, entre d'altres, els ganglis limfàtics o la melsa⁵⁷. Al contrari que la resta de limfòcits B, els limfòcits B fol·liculars necessiten l'ajuda d'un limfòcit T per a la seva activació completa (activació T-dependent).

3. El sistema immunitari en el context de la mort cel·lular

Tradicionalment, s'han diferenciat 3 tipus de mort cel·lular en funció de les seves característiques morfològiques: apoptosi, autofàgia i necrosi^{58,59}. L'**apoptosi** es caracteritza per la fragmentació nuclear, la condensació de la cromatina i *blebbing* en la membrana

citoplasmàtica, que culmina amb la formació de petites vesícules conegudes com a cossos apoptòtics. Les cèl·lules apoptòtiques són fagocitades, la qual cosa fa que l'apoptosi sigui un procés silenciós per al sistema immunitari. L'**autofàgia** es caracteritza per la formació de vacuoles al citoplasma i, de la mateixa manera que en l'apoptosi, les cèl·lules autofàgiques són fagocitades i degradades via lisosomal. La **necrosi** no compleix cap de les característiques dels dos tipus de mort cel·lular anteriors i la cèl·lula mor sense cap mena de control, alliberant tot el contingut citoplasmàtic a la zona intersticial⁶⁰. Es tracta, per tant, d'un procés no silenciós per al sistema immunitari.

Fins fa poc, la gran diferència entre l'apoptosi i la necrosi era que la primera es considerava una forma de mort totalment regulada, mentre que la segona no disposava de cap tipus de control per part de la pròpia cèl·lula. Aquesta descripció, però, ha quedat obsoleta ja que s'han descrit formes de necrosi controlades, com la piroptosi i la necroptosi, entre d'altres^{59,61}. De la mateixa manera, estudis recents han demostrat que quan les cèl·lules fagocítiques no poden eliminar a les cèl·lules apoptòtiques, aquestes agafen un altre tipus de via coneguda com necrosi secundària, la qual deixa de ser silenciosa per al sistema immunitari. Tot i així, al tractar-se d'una cèl·lula apoptòtica, els possibles DAMPs de la cèl·lula ja s'han atenuat i la resposta inflamatòria que genera és menor que la que es dona en la necrosi⁶². Actualment, ens referim a la mort cel·lular descontrolada com a mort cel·lular accidental o ACD (de l'anglès *Accidental Cell Death*). En canvi, ens referim a mort cel·lular regulada o RCD (de l'anglès, *Regulated Cell Death*) quan parlem de tots aquells tipus de mort cel·lular en la que s'activa una maquinària molecular que la indueix, i que per tant esdevenen morts cel·lulars de manera totalment controlada. Durant les darreres dècades s'han acumulat un gran conjunt d'evidències experimentals que descriuen i caracteritzen en més detall diferents mecanismes de RCD més enllà de l'apoptosi, l'autofàgia i la necrosi⁶³ (figura 2). Cadascun d'aquests tipus de mort cel·lular s'inicia i es propaga per mecanismes moleculars que presenten un grau d'interconnectivitat considerable. A més a més, cada tipus de RCD es pot manifestar amb tot un espectre de característiques morfològiques que van des del fenotip completament necròtic fins al completament apoptòtic, i un perfil immunomodulador que va des d'antiinflamatori i tolerogen fins a proinflamatori i immunogènic.

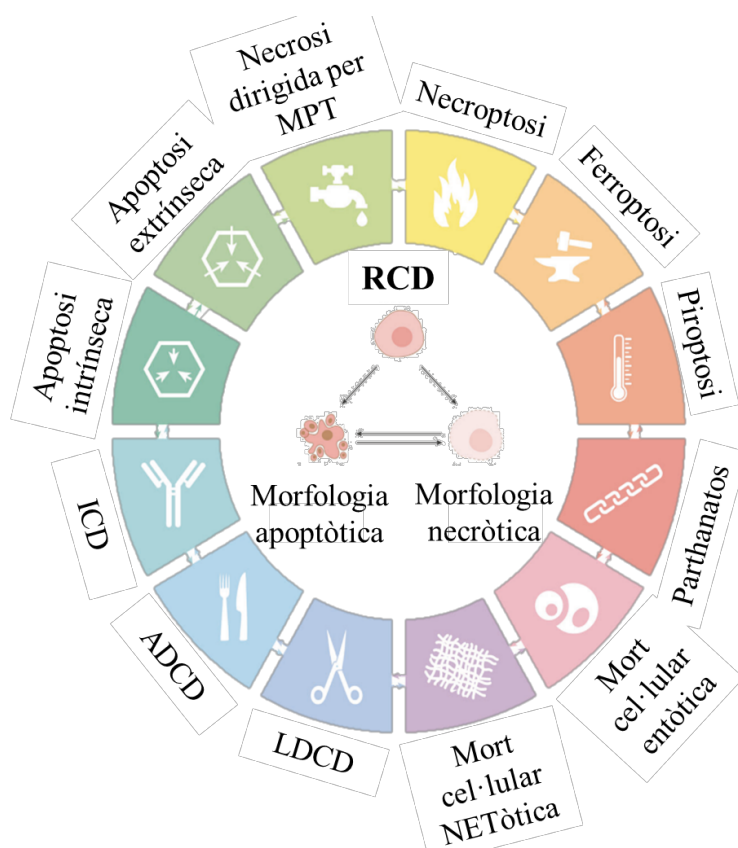


Figura 2. Principals subtipus de mort cel·lular. Adaptat de l'article de Galluzzi L. et. al. (2018)⁵⁹. ADCD: *Autophagy-Dependent Cell Death*, ICD: *Immunogenic Cell Death*, LDCD: *Lysosome-Dependent Cell Death*, MPT: *Mitochondrial Permeability Transition*.

3.1. Apoptosi

L'apoptosi és un tipus de mort cel·lular regulada que esdevé de manera silenciosa per al sistema immunitari. Existeixen dos tipus d'apoptosi en funció de l'estímul que la causi. Quan és causada per dany al ADN, estrès de reticle endoplasmàtic o defectes mitòtics, parlem d'apoptosi intrínseca. Pel contrari, quan és causada per la unió d'un lligand a un receptor de mort de membrana o bé per la disminució de la concentració habitual d'aquest lligand, parlem d'apoptosi extrínseca. Malgrat comparteixen algunes vies i mecanismes, com la necessitat de les caspases i la seva actuació o la fragmentació nuclear al final del procés⁶⁴, les vies moleculars per les quals s'activen els dos tipus d'apoptosi són diferents^{59,61} (figura 3).

3.1.1. Apoptosi intrínseca

L'apoptosi intrínseca és una forma de mort cel·lular regulada que pot iniciar-se per una gran varietat d'estímuls, com per exemple dany l'ADN, estrès de reticle endoplasmàtic o sobrecàrrega de ROS (de l'anglès, *Reactive Oxygen Species*), entre d'altres⁶⁵⁻⁷⁰. En resposta a un d'aquests estímuls, les proteïnes pro-apoptòtiques (com BAX, BAK o BOB) generen

porus a la membrana externa del mitocondri, fenomen que es coneix com permeabilització de la membrana externa mitocondrial o MOMP (de l'anglès, *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*)⁵⁸. Aquest fet dona lloc a l'alliberament de citocrom C, entre d'altres components, al citosol^{71,72}. Aquest s'uneix a APAF1 (de l'anglès, *Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*) i a la pro-caspasa-9 per tal de formar l'apoptosoma⁷³, el qual és responsable de l'activació de la caspasa-9. Un cop activada, aquesta activa a les caspases executores caspasa-3 i caspasa-7, induint així la destrucció cel·lular^{59,61}. Aquestes caspases efectores són les responsables de les característiques morfològiques i bioquímiques de l'apoptosi, com són la fragmentació nuclear, l'exposició de fosfatidilserina i la formació dels cossos apoptòtics⁷⁴⁻⁷⁶.

3.1.2. Apoptosi extrínseca

L'apoptosi extrínseca és un tipus de mort cel·lular programada que es genera en resposta a pertorbacions en el microentorn extracel·lular⁷⁷⁻⁸⁰. Normalment és induïda a través de dos tipus de receptors de membrana: els receptors de mort, com FAS (de l'anglès, *Fas Cell Surface death receptor*) o TNFR1 (de l'anglès, *TNF Receptor Superfamily member 1*), i els receptors dependents (família de més de 20 molècules diferents⁷⁹). Els receptors de mort indueixen l'activació de l'apoptosi extrínseca quan s'uneixen al seu lligand, mentre que els receptors dependents ho fan quan la concentració òptima del lligand disminueix^{59,79,81,82}. FAS s'uneix al seu lligand la qual cosa indueix un canvi conformacional i permet que s'uneixi a FADD (de l'anglès, *Fas-Associated Death Domain*), que alhora s'uneix al complex DISC (de l'anglès, *Death Inducing Signalling Complex*). Aquest últim s'uneix a la pro-caspasa-8 i l'activa. TNFR1, per la seva banda, s'uneix a TRADD (de l'anglès, *TNFR1 Associated Death Domain*) que, al igual que FADD, funciona com a adaptador per al complex DISC. En qualsevol dels casos, s'activa la caspasa-8, que alhora activa a les caspases efectores caspasa-3 i caspasa-7, desencadenant així la mort de la cèl·lula^{59,61}. En el cas dels receptors dependents, s'activa l'apoptosi quan disminueix la concentració del lligand, normalment mitjançant la caspasa-9 que, finalment, activa la caspasa-3⁸³.

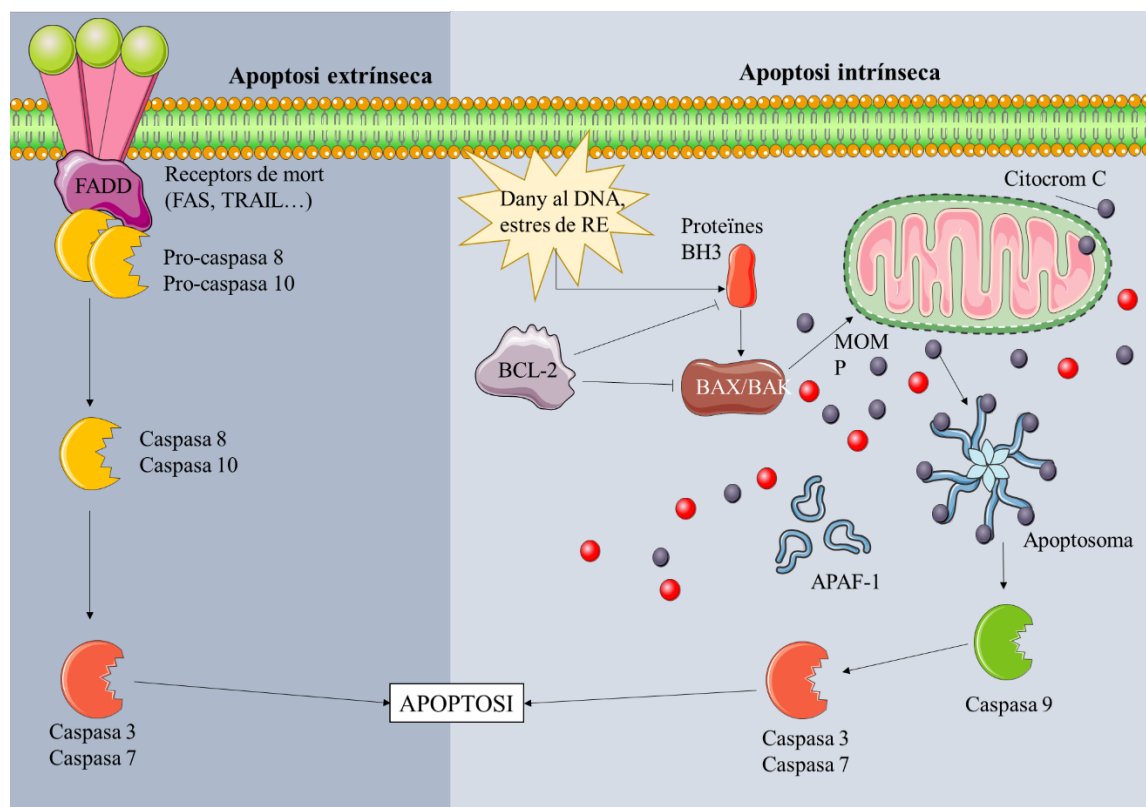


Figura 3. Resum de les vies intrínseca i extrínseca de l'apoptosi. Adaptació de l'article de Ichim et al. (2016)⁸⁴.

3.2. Piroptosi

La piroptosi és una forma de mort cel·lular regulada que es desencadena a causa de pertorbacions en l'homeòstasi extracel·lular o intracel·lular relacionades amb la immunitat innata (per exemple, la invasió de patògens)⁸⁵. Les característiques morfològiques específiques de la piroptosi inclouen, entre d'altres, una forma peculiar de condensació de la cromatina diferent a la que es dona en l'apoptosi o una inflor cel·lular (*cellular swelling*) que provoca la permeabilització de la membrana plasmàtica⁸⁵. Està mediada per la formació i l'activació de l'inflamasoma, el qual té funcions que recorden tant a l'apoptosi (activació de caspases) com a la necrosi (formació de porus a la membrana)⁶¹.

L'inflamasoma és un complex multimèric que forma part de la resposta innata i la seva formació depèn de les senyals DAMP o PAMP. Participa en la immunitat innata a través de l'activació de la caspasa-1, la qual és essencial per a la conversió de les proformes de les citocines proinflamàtores IL-1 β i IL-18, i causar aquest tipus de mort cel·lular inflammatòria o piroptosi⁸⁶. En funció de les molècules que el formen, es diferencien diversos tipus d'inflamasoma, com els inflasomes NLRP3 (de l'anglès *NOD-Like Receptor-Pyrin domain containing 3*), NLRC4 o AIM-2.

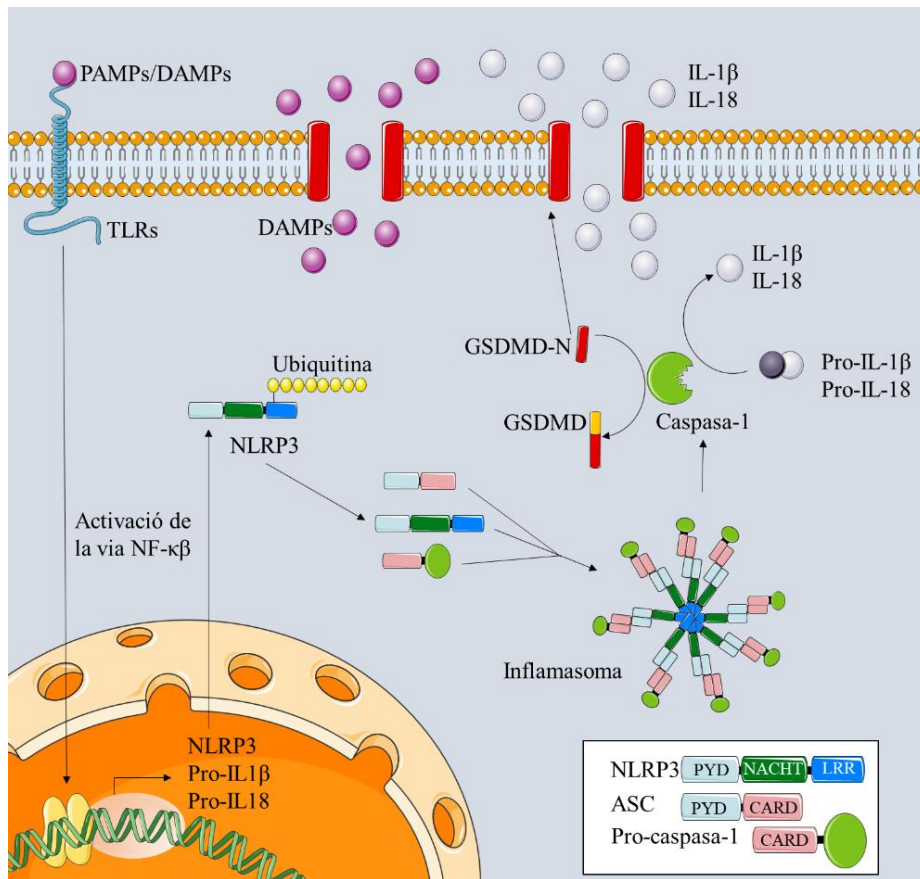


Figura 4. Mecanismes canònics d'activació de l'inflamasoma NLRP3. L'inflamasoma NLRP3 necessita un estímul mitjançant receptors PRR que promouin la formació i producció de les molècules NLRP3 a través de la via NF-κβ. Una vegada sintetitzades, i mentre no es forma l'inflamasoma, les molècules NLRP3 són ubiquitinitzades de manera que no poden interactuar amb altres proteïnes. Gràcies a un segon estímul, aquestes molècules NLRP3 s'uneixen per formar l'inflamasoma^{86,87}. A més a més, s'uneixen mitjançant el seu domini PYD (de l'anglès, *N-terminal Pyrin Domain*) a la molècula ASC (de l'anglès, *Apoptosis-Associated Protein Containing a CARD*). Aquesta última, s'uneix a la pro-caspasa-1 a través del seu domini CARD, i l'activa. És la caspasa-1 la que promou la formació de porus de GSDMD i genera les formes actives de la IL-1β i la IL-18⁸⁶⁻⁸⁹.

La piroptosi es caracteritza per la formació de porus a la membrana cel·lular mitjançant la gasdermina D (GSDMD), la qual cosa facilita la secreció de citocines proinflamatòries i productes citosòlics, activant d'aquesta manera al sistema immunitari adaptatiu. Parlem de vies canòniques de l'inflamasoma quan l'activació d'aquest dona lloc a l'activació de la caspasa-1⁹⁰. És la forma activa d'aquesta la que modifica les proformes de les citocines pro-IL-1β i pro-IL-18 per a generar les seves formes actives, la IL-1β i la IL-18, respectivament (figura 4). A més a més, la caspasa-1 activa la GSDMD, que és la responsable de la formació dels porus a la membrana a través dels quals es secreten els diferents DAMPs que s'han generat⁸⁶⁻⁸⁹. Quan la GSDMD no està disponible, la caspasa-1 és capaç d'activar la caspasa-3 i la 7 i induir una mort per apoptosi⁹¹.

Quan l'inflamasoma dona lloc a l'activació de caspases diferents a la caspasa-1, parlem de vies no canòniques de l'inflamasoma. L'inflamasoma NLRP3 pot activar la caspasa-11 en ratolins o les seves equivalents en humans, la caspasa-4 i la caspasa-5⁹². D'altra banda, s'ha demostrat que la caspasa-8 és capaç d'induir l'inflamasoma de diverses maneres, induint en alguns casos l'activació de la caspasa-1 o fins i tot, essent la pròpia caspasa-8 capaç d'activar la formació i secreció de les citocines proinflamàtores⁹³. En qualsevol dels casos, s'acaba promovent la producció de citocines inflamatòries així com la formació de porus mitjançant la GSDMD^{86,87,90}.

3.3. Necroptosi

Quan alguns patògens inhibeixen l'activació de les caspases, les cèl·lules disposen de vies alternatives de mort cel·lular com, per exemple, la necroptosi. Aquesta, per tant, és un tipus de mort cel·lular programada que es pot dur a terme sense la participació de les caspases⁵⁸. S'activa quan els receptors de mort o algun PRR detecta un canvi en el microentorn intra o extracel·lular. Quan la caspasa-8 no està disponible, RIPK1 (de l'anglès, *Receptor Interacting Protein Domain*) activa la molècula RIPK3, formant juntes un complex conegut amb el nom de necrosoma. Aquest fosforila la proteïna MLKL (de l'anglès, *Mixed Lineage Kinase-Like*), el qual permet la seva polimerització i, en conseqüència, la formació de porus en la membrana plasmàtica^{58,59,89}. De la mateixa manera que en la piroptosi, la formació de porus fa que s'alliberin molècules DAMP i citocines.

3.4. Mort cel·lular immunogènica

La mort cel·lular immunogènica o ICD (de l'anglès, *Immunogenic Cell Death*) és un tipus de mort cel·lular programada que promou l'activació d'una resposta immunitària adaptativa específica enfront antígens endògens (cel·lulars) o exògens (agents infecciosos) expressats per les cèl·lules que moren. La ICD s'activa enfront estímuls determinats, com per exemple infeccions virals, quimioteràpics o formes específiques de radioteràpia. Aquests, estimulen l'alliberament puntual d'una sèrie de DAMPs, els quals són reconeguts per part dels PRRs expressats per les cèl·lules innates del sistema immunitari. Aquest reconeixement promou l'activació i maduració d'aquestes cèl·lules, que migren cap als ganglis limfàtics on presenten antígens específics als limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺, els quals són els responsables de generar una resposta immunitària adaptativa, generalment associada a l'establiment de memòria immunològica^{59,94}.

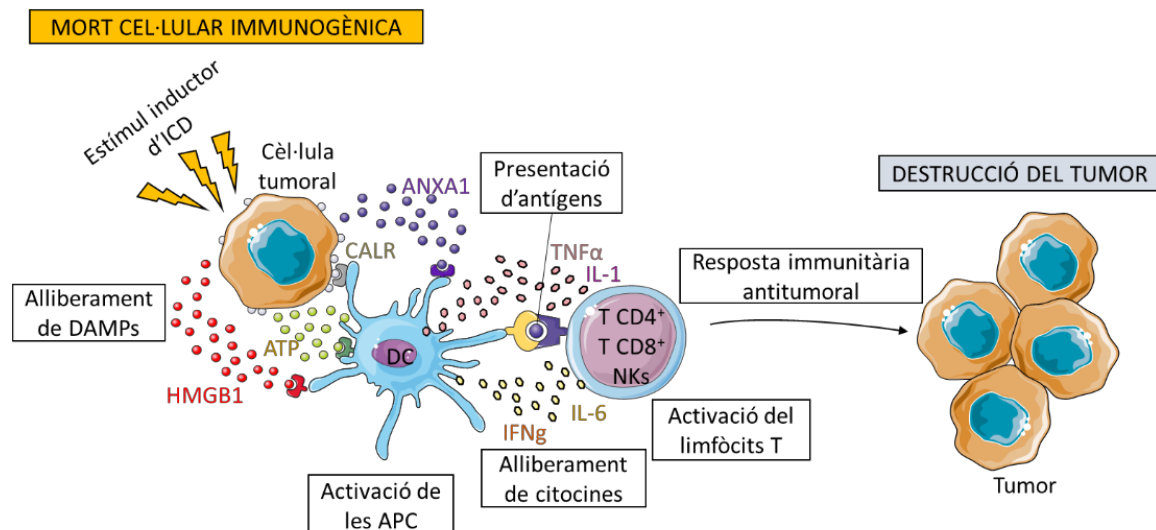


Figura 5. Mort cel·lular immunogènica en el context d'una resposta antitumoral.

La presència de calreticulina (CALR), ATP, HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1*), o annexina A1 (ANXA1), entre d'altres, s'han relacionat amb tipus de morts immunogènics^{59,95,96}. En el transcurs de la ICD, la CALR es transloca del reticle endoplasmàtic cap a la capa externa de la membrana plasmàtica. Aquest és un fenomen associat a estadis primerencs de la mort cel·lular immunogènica, fins i tot previ a l'exposició de la fosfatidilserina⁹⁷. Un cop exposada a la superfície, la CALR funciona com a senyal de “menja'm” per a les cèl·lules fagocítiques, que posteriorment presentaran l'antigen a les cèl·lules T citotòxiques⁵⁹. Per la seva banda, l'ATP extracel·lular actua com a senyal atractiu per als macròfags i precursors de les cèl·lules dendrítiques. També activa la via canònica de l'inflamasoma a través de la unió a P2RX⁹⁸. Els mecanismes moleculars subjacents a l'alliberament de HMGB1 i ANXA1 encara no han estat del tot dilucidats. Un cop secretat, HMGB1 té un potent efecte proinflamatori gràcies a la unió als receptors TLR2, TLR4 i RAGE. La unió de HMGB1 amb TLR4 promou el processament d'antígens i la presentació creuada per part de les DCs⁹⁹, però es necessita de la unió amb RAGE per a que aquestes madurin¹⁰⁰. Finalment, la presència extracel·lular de ANXA1 actua com a DAMP i participa en l'activació de respostes immunitàries adaptatives¹⁰¹.

4. Estudi de la resposta autoimmunitària: La Diabetis Tipus 1

El sistema immunitari disposa de diferents mecanismes per tal de controlar i eliminar a tots aquells limfòcits autoreactius. Tot i així, una part de la població humana pot desenvolupar malalties autoimmunitàries degut a defectes en la regulació d'aquests mecanismes¹⁰².

La diabetis tipus 1 o T1D (de l'anglès, *Type 1 Diabetes*) és una malaltia autoimmunitària que es caracteritza per la destrucció selectiva de les cèl·lules β dels illots pancreàtics de Langerhans per part dels limfòcits T, tant $CD8^+$ com $CD4^{+103}$. En condicions fisiològiques, les cèl·lules β són les encarregades de secretar insulina, la funció principal de la qual és promoure l'entrada de glucosa a les cèl·lules per tal de reduir els elevats nivells d'aquesta en sang. Els pacients diabètics necessiten administració de per vida d'insulina exògena per tal de regular els seus nivells de glucosa. Tot i així, la hiperglucèmia és difícil de controlar i, al final, els pacients desenvolupen diferents lesions vasculares derivades d'aquests elevats nivells de sucre en sang. Aquestes lesions poden derivar en complicacions molt serioses com poden ser nefropaties, retinopaties, neuropaties perifèriques i, fins i tot, problemes cardiovasculars, entre d'altres¹⁰⁴.

Abans de l'aparició de la fase clínica de la diabetis tipus 1, existeix una fase preclínica anomenada insulinitis. Durant aquest període, hi ha una resposta autoimmunitària enfront les cèl·lules β i s'inicia el procés d'infiltració (limfòcits T $CD4^+$ i $CD8^+$, cèl·lules NK, limfòcits B, cèl·lules dendrítiques i macròfags) als illots pancreàtics, la qual provoca una destrucció progressiva de les cèl·lules β . Quan es supera el 80% de mortalitat en aquesta població cel·lular és quan comença la fase clínica de la T1D. Aquesta es caracteritza per la incapacitat de controlar els nivells de glucosa en sang, la qual cosa provoca hiperglucèmia però també cetoacidosi, glicosúria, poliúria i polidípsia¹⁰⁵. Els limfòcits T són els principals responsables del dany a les cèl·lules β , tot i que els limfòcits B són essencials en l'inici i el desenvolupament de la T1D. Es creu que els autoantígens β pancreàtics són capturats per els limfòcits B i, posteriorment, presentats als limfòcits T, els quals s'activen i promouen la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques¹⁰⁶.

4.1. Pàncrees i diabetis tipus 1

El pàncrees és un òrgan glandular mixt que es troba entre l'estómac i la corba del duodè i que està compost per dues parts principals: el pàncrees exocrí i el pàncrees endocrí. El pàncrees exocrí és l'encarregat de secretar enzims digestius i conforma la major part del pàncrees. El pàncrees endocrí, en canvi, representa només el 1-2% del teixit pancreàtic i té

com a missió la producció de diferents tipus d'hormones. Està conformat per diferents tipus cel·lulars que es troben agrupats en formacions que s'anomenen illots pancreàtics o illots de Langerhans, situats en mig del teixit exocrí. En els ratolins, els illots pancreàtics estan formats per un nucli de cèl·lules β productores d'insulina que representa aproximadament el 70% de les cèl·lules de l'illot. Delimitant aquest nucli trobem diferents tipus de cèl·lules endocrines: cèl·lules α (20%), cèl·lules γ (5-10%) i cèl·lules PP (2%)¹⁰⁷ (figura 6). Aquesta estructura és una mica més complexa en humans i altres primats, formada per diversos nuclis de cèl·lules β en un mateix illot¹⁰⁸. El pàncrees humà conté al voltant d'un milió d'illots, els quals estan formats per un nombre variable de cèl·lules (entre 2.500 i 12.000).

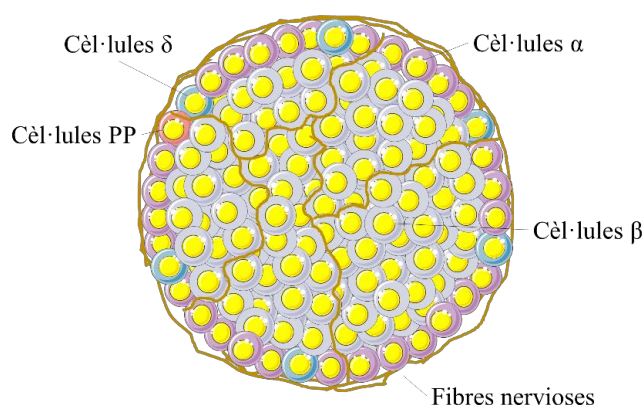


Figura 6. Esquema de l'organització dels illots pancreàtics murins.

Els illots pancreàtics estan envoltats per les cèl·lules de Schwann i per una membrana basal. Juntament amb les neurones que innerven els illots, creen una xarxa complexa que envolta i penetra en l'illot. Les cèl·lules de Schwann són cèl·lules de la glia que expressen GFAP (de l'anglès, *Glial Fibrillary Acidic Protein*)¹⁰⁹. Els illots pancreàtics estan altament innervats i vascularitzats, la qual cosa els permet rebre diferents senyals fisiològics i respondre a ells mitjançant la secreció de diferents tipus d'hormones. Es diferencien 3 tipus d'innervació: simpàtica, parasimpàtica i sensorial. Les neurones alliberen neurotransmissors per tal de comunicar-se amb les cèl·lules de l'illot. Les neurones parasimpàtiques alliberen acetilcolina; les simpàtiques, noradrenalina¹¹⁰; i les sensorials, substància p (Sp) i CGRP (de l'anglès, *Calcitonin-Gen-Related Peptide*)¹¹¹.

Les fibres eferents simpàtiques entren a l'illot al llarg dels vasos sanguinis i alliberen noradrenalina dels seus terminals¹¹⁰, estimulant la secreció de glucagó mitjançant la unió als receptors β -adrenèrgics de les cèl·lules α i inhibint la secreció d'insulina mitjançant l'activació dels receptors α_2 -adrenèrgics de les cèl·lules β . Les fibres simpàtiques aferents tenen el seu cos cel·lular als ganglis dorsals raquidis o DRG (de l'anglès, *Dorsal Root*

Ganglia) i es projecten cap a les làmines I i IV de la medul·la espinal. Les fibres parasimpàtiques eferents innerven els ganglis intrapancreàtics, que, al seu torn, envien aportació colinèrgica a l'illot per estimular la secreció de glucagó augmentada de les cèl·lules α i potenciar la secreció d'insulina mitjançant l'alliberament local d'acetilcolina a través dels receptors muscarínics de les cèl·lules β . En resposta a la hipoglucèmia, l'augment de l'activitat simpàtica inhibeix la secreció d'insulina, mentre que l'augment de l'activitat simpàtica i parasimpàtica estimula la secreció de glucagó (figura 7).

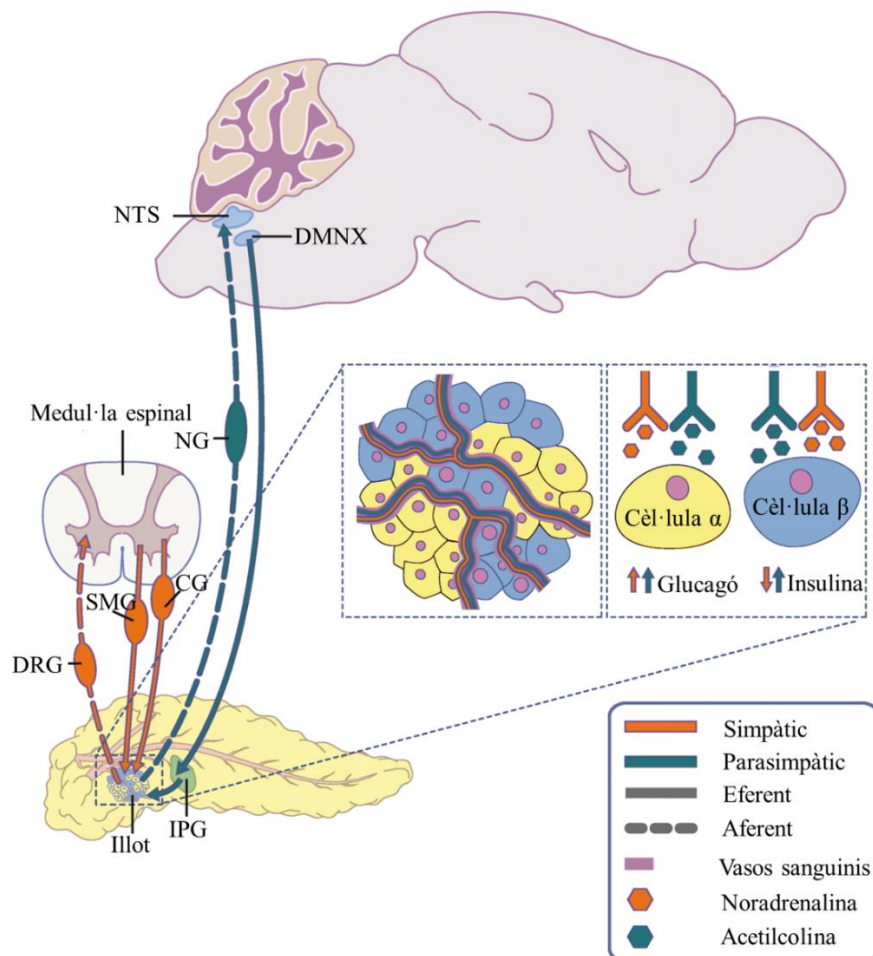


Figura 7. Innervació sensorial i autònoma del pàncrees endocrí. Adaptació de l'article de Faber et. al. (2020)¹¹². NTS: *Nucleus of the Solitary Tract*. DMNX: *Dorsal Motor Nucleus of the Vagus*. NG: *Nodose Ganglion*. DRG: *Dorsal Root Ganglia*. SMG: *Superior Mesenteric Ganglia*. CG: *Celiac Ganglia*. IPG: *Intrapancreatic Ganglia*.

4.2. Epidemiologia

La incidència de T1D varia en funció del país, diagnosticant més de 20 casos per cada 100.000 persones a l'any en països com Finlàndia, Canadà, Noruega o Portugal, mentre que a Xina o Sudàfrica és menor a 1 cas per cada 100.000 persones a l'any. De totes maneres, la incidència ha augmentat globalment un 3-4% en les tres últimes dècades¹¹³ i és

més prevalent en nens de 10 a 14 anys, essent més del 85% dels casos diagnosticats menors de 20 anys.

4.3. Etiologia

La diabetis tipus 1 és una malaltia multifactorial. Malgrat alguns dels factors genètics són, per si mateixos, capaços de causar la patologia, en la majoria de casos es necessita una combinació de factors genètics i ambientals per tal que es doni el procés autoimmunitari característic de la T1D.

4.3.1. Factors genètics

A mitjans dels anys 2000 es van realitzar una sèrie d'estudis d'associació del genoma amb la T1D (GWAS o *Genome-Wide Association Studies*), que van permetre identificar prop de 50 locus de susceptibilitat en el genoma relacionats amb el risc a desenvolupar diabetis tant en humans (locus IDDM o *Insulin Dependent Diabetes Mellitus*) com en ratolins (locus Idd o *Insulin Dependent Diabetis*)¹⁰⁹. En molts casos, només es coneix la regió cromosòmica que causa aquesta susceptibilitat, però no quin gen. Els locus de susceptibilitat es poden dividir en dos grups:

- **Relacionats amb el sistema immunitari.** La major associació es dona amb HLA DR i HLA DQ, que formen part del grup dels HLA (de l'anglès, *Human Leucocyte Antigen*) de tipus II. Això influeix en la presentació dels autoantígens als limfòcits CD4⁺, generant una resposta adaptativa no desitjada contra les cèl·lules β. També s'han detectat altres modificacions en pacients amb T1D que recullen polimorfismes genètics en CTLA-4 (receptor inhibidor dels limfòcits T), UBASH3A (que redueix la generació de IL-2) i IL2RA (polimorfismes genètics en el receptor de la IL-2 que influeixen en la generació de limfòcits T reguladors)¹¹⁴.
- **Relacionats amb les cèl·lules β**, ja sigui influent en el seu estat funcional, com la no expressió de GLIS3 o GLEC2, o induint l'apoptosis d'aquestes cèl·lules, com quan es disminueix l'expressió de PTPN2 o BACH2 o incrementa l'expressió de CTSH¹¹⁵. El gen de la insulina també pertany a aquest grup, ja que tant aquesta com els seus precursors podrien esdevenir autoantígens¹¹⁴. Es localitza al locus de susceptibilitat IDDM2.

4.3.2. Factors ambientals

La variabilitat epidemiològica entre països ha fet que, al llarg dels últims anys, s'hagi donat importància a l'anàlisi dels diferents factors ambientals que poden influir en el

desenvolupament de la T1D. A més a més, en el cas dels ratolins NOD (de l'anglès, *Non Obese Diabetic*), la incidència de diabetis autoimmunitària varia en funció de les condicions d'estabulació, essent major en condicions de SPF (de l'anglès *Specific Pathogen Free*), quan es modifica la composició de la dieta o quan se'ls canvia la microbiota¹¹⁶.

4.3.3. *Factors epigenètics*

Malgrat encara no s'ha aprofundit en el paper de l'epigenètica en la T1D, dades preliminars suggereixen que pot influir en la susceptibilitat d'alguns gens relacionats amb la malaltia. En els últims anys, s'han descrit enriquiments en metilacions (mQTL, de l'anglès *methylation Quantitative Trait Loci*) en gens coneguts i relacionats amb el desenvolupament de la malaltia com HLA o PTPN2, la qual cosa suggereix un paper rellevant de l'epigenètica en la T1D^{115,117}. A més a més, s'ha observat que la inhibició de la desacetilació en les histones redueix l'apoptosi produïda per citocines a les cèl·lules β , assegurant el seu benestar¹¹⁸.

4.3.4. *Factors estocàstics*

Tot i conèixer els diferents factors que poden influir en el desenvolupament de la T1D, actualment és impossible saber amb certesa qui la patirà, doncs l'atzar juga un paper molt important. Com s'ha esmentat anteriorment, és necessària la conjunció de diferents factors genètics i ambientals en un mateix individu per tal que s'origini el procés autoimmunitari que donarà lloc a l'aparició de la malaltia.

4.4. *Immunopatologia de la diabetis*

El desenvolupament de la T1D es dona en tres etapes principals, tant en ratolins com en humans. Primer de tot, es genera una resposta limfocitària enfront les cèl·lules β degut a algun insult. Aquesta ve seguida d'una resposta altament proinflamatòria. Per últim, fallen els controls de tolerància i es desencadena una destrucció de les cèl·lules β que deriva en la T1D.

4.4.1. *Mecanismes efectors: els limfòcits T*

L'activació dels limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ es produeix en els ganglis limfàtics perifèrics i és essencial per al desenvolupament de la T1D¹¹⁹. Les APCs presenten els autoantígens dels illots pancreàtics i activen als dos tipus de limfòcits T¹²⁰. Aquesta activació fa patent que els pacients tenen un error en la selecció tímica que pot ser degut a dues coses: primer, que els TCRs dels limfòcits autoreactius no uneixen correctament el seu antígen, seleccionant-lo positivament com a resultat d'una senyal de baixa afinitat; o, segon, que els

limfòcits T reconeguin un antigen que no es presenta al timus degut a modificacions post-transcripcionals (com la IA-2 o la IGRP)¹²¹. Es creu que en un primer estadi s'activen els limfòcits T CD4⁺ autoreactius i, posteriorment, els limfòcits T CD8⁺. Aquests es desplacen a l'illot on destrueixen les cèl·lules β ¹²⁰.

La importància dels limfòcits T CD4⁺ ha estat demostrada en ratolins NOD, ja que l'eliminació d'aquesta població cel·lular endarrereix o, fins i tot, evita el desenvolupament de la malaltia¹²². Una vegada activats, molts adquireixen un fenotip Th1, produint elevades quantitats de IFN γ , el qual contribueix a la generació de la resposta contra els illots mitjançant l'augment de l'expressió dels dos tipus de MHC, l'activació dels macròfags i el reclutament de més limfòcits al pàncrees¹²³. També adquireixen un fenotip T_{FH}, el qual és important per a que els limfòcits B produeixin anticossos contra els antigens de l'illot. S'ha postulat que la seva detecció en sang podria ser un bon biomarcador del desenvolupament de T1D en humans¹²⁴.

Un cop activats els limfòcits T CD4⁺, aquests promouen l'activació dels limfòcits T CD8⁺ citotòxics que indueixen la destrucció de les cèl·lules β . Els limfòcits T CD4⁺ també activen als macròfags que, juntament amb els limfòcits B, produeixen citocines que activen una resposta humoral a través de la producció d'anticossos característics de la T1D¹²⁵. A banda d'activar els altres tipus cel·lulars, amb l'ajuda d'algunes citocines proinflamàtores els limfòcits T CD4⁺ poden convertir-se en cèl·lules citotòxiques amb capacitat d'eliminar les cèl·lules β mitjançant FAS.

Tot i així, malgrat els limfòcits T CD4⁺ són importants en la patogènesi de la diabetis i els limfòcits T CD8⁺ són els principals responsables de la destrucció de les cèl·lules β , els limfòcits B són essencials per al desenvolupament de la malaltia, ja que estudis en el model NOD demostren que sense la presència de limfòcits B els ratolins no desenvolupen T1D¹²⁶.

4.4.2. *Mecanismes efectors: els limfòcits B*

Malgrat els limfòcits T són els responsables principals de la destrucció de les cèl·lules β , es necessita de l'acció d'altres cèl·lules del sistema immunitari per a que es desenvolupi el procés diabetogènic, com són els macròfags, les cèl·lules dendrítiques i els limfòcits B¹²⁰. Totes elles actuen com a cèl·lules presentadores d'antigen a limfòcits T. El primer contacte que tenen els limfòcits T amb les cèl·lules APC és als ganglis limfàtics regionals, on aquestes últimes presenten els antigens¹²⁷. Normalment, presenten antigens propis, procedents de la regeneració de teixits, que són presentats als limfòcits T. Si la presentació

es porta a terme sense la presència de molècules coestimuladores i citocines proinflamàtores (IL-2, IL-4), els limfòcits T que reconeixen antígens propis són anergitzats. En canvi, si els autoantígens es presenten juntament amb molècules coestimuladores i citocines, s'indueix l'activació dels limfòcits T CD4 autoreactius¹²⁸.

La participació dels limfòcits B i, concretament, dels anticossos contra els diferents autoantígens en el transcurs de la T1D ha estat font de discussió durant anys. Malgrat s'han detectat anticossos contra els diferents antígens dels illots en el 90% dels pacients amb T1D¹²⁹, el paper que aquests desenvolupen és desconegut. S'ha vist que els ratolins NOD transgènics o *knock out* en els que els limfòcits B no poden secretar anticossos, el desenvolupament de la malaltia és menor que en ratolins NOD normals. De la mateixa manera, s'ha mostrat que la supressió de l'expressió de la molècula MHC de classe II (I-Ag7) a la superfície cel·lular dels limfòcits B aporta resistència a la diabetis en els ratolins, encara que aquests presentin altres APCs capaces d'activar els limfòcits T CD4¹³⁰. En conjunt, tot això confirma que els limfòcits B contribuirien a la malaltia actuant com a APCs activant limfòcits CD4 autoreactius.

4.5. La diabetis tipus 1 i el sistema nerviós

Malgrat les cèl·lules β són la principal diana de l'atac autoimmunitari que es dona en la T1D, sembla que aquestes no en són les úniques. Entre els autoantígens descrits en la T1D trobem la pro-insulina, GAD65 i GAD67, IA-2, ICA69, S100 β , HSP60 i IGRP¹³¹. Molts d'aquests antígens no es troben solament a les cèl·lules β pancreàtiques, sinó que també s'expressen en cèl·lules del sistema nerviós. Això podria explicar l'atac que pateixen les neurones que envolten els illots pancreàtics. A més a més, s'ha descrit la presència de limfòcits T i B autoreactius contra antígens del sistema nerviós en estadis inicials de la malaltia¹³². Això suggereix que l'atac a les cèl·lules neuronals podria ser previ a l'atac a les cèl·lules β pancreàtiques.

En estreta associació amb aquestes neurones hi podem trobar un conjunt de cèl·lules glials que envolten el perímetre de l'illot. Aquest mantell està format per cèl·lules Schwann peri-illots (pSCs, de l'anglès *peri-islet Schwann Cells*), que separen físicament les parts exocrina i endocrina del pàncrees¹³³. La seva funció és desconeguda, però probablement sigui similar a la de la resta de cèl·lules glials. En la T1D, les pSCs són selectivament destruïdes en estadis primerencs de la resposta contra les cèl·lules β . De fet, ruptures en aquest recobriment de cèl·lules glials podrien ser previs a la invasió de les cèl·lules T a l'illot.

Les cèl·lules neuronals, a banda d'interaccionar amb les cèl·lules de l'illot per tal de regular la producció d'hormones, també interaccionen amb les cèl·lules del sistema immunitari infiltrants en els illots durant el procés de resposta autoimmunitària de la T1D. El sistema nerviós és capaç de modular la resposta immunitària mitjançant l'alliberament de neurotransmissors als extrems terminals de les neurones^{134,135}.

El sistema nerviós central i els teixits perifèrics es relacionen principalment a través de les neurones sensorials aferents primàries. Aquestes són un component crític en l'inici de la prediabetis, ja que són responsables de l'alteració de l'homeostasi de la glucosa i l'estrès progressiu de les cèl·lules β , la qual cosa provoca una inflamació dels illots pancreàtics¹³². Aquestes neurones sensorials aferents sorgeixen de petites neurones primàries que tenen els seus nuclis en els ganglis dorsals raquidis.

Un subconjunt important de neurones aferents primàries expressa TRPV1 (de l'anglès, *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*), un canal de catió inespecífic implicat en la detecció de termotrauma (≥ 44 °C), àcid (H^+)¹³⁶ i altres factors bioquímics. També tenen una funció eferent mitjançant l'alliberament local de mediadors com ara neuropèptids (sP i CGRP)¹³⁷. De la mateixa manera que la majoria de teixits, el pàncrees exocrí i endocrí està innervat per neurones TRPV1^{+138,139}, les quals són de rellevant importància en les reaccions proinflamàtoies¹⁴⁰. A més a més, els limfòcits infiltrants dels illots expressen receptors de neuropèptids¹⁴¹. El gen TRPV1 està localitzat al locus de susceptibilitat a T1D Idd4.1¹⁴². En el model NOD, s'ha descrit un defecte funcional en les cèl·lules sensorials, concretament, en les cèl·lules que expressen el receptor TRPV1. Dosch *et al.* suggereixen que la supressió de TRPV1 neural en ratolins NOD, redueix la infiltració de leucòcits i l'aparició de T1D. Totes aquestes evidències semblen apuntar a un paper de les neurones sensorials en la T1D. Recentment, també s'ha correlacionat mutacions en aquesta proteïna amb l'aparició de la malaltia en humans¹⁴³.

Per tant, la relació entre el sistema immunitari i els elements neuroendocrins de l'illot pancreàtic podria ser més complexa que un simple atac autoimmunitari. Caldria conèixer amb més profunditat les interaccions que hi ha entre les neurones, les cèl·lules de l'illot i les cèl·lules immunitàries en el decurs de la malaltia per tal de conèixer millor l'etiologia de la T1D.

4.6. Model murí d'elecció per a l'estudi de la diabetis autoimmunitària: el ratolí NOD i la seva variant, el ratolí NOD.Rag2^{-/-}

La obtenció de mostres humanes per a l'estudi de la T1D és complicada degut a que la malaltia es desenvolupa en un òrgan complex d'estudiar per a la seva localització anatòmica. És per això, que durant les últimes dècades, la majoria dels estudis s'han realitzat en dos models animals que desenvolupen la diabetis autoimmunitària de manera espontània: les rates BB (del anglès, *BioBreeding*) i els ratolins NOD (de l'anglès, *Non-Obese Diabetic*). Aquest últim és el més utilitzat en l'estudi de la T1D degut a les grans similituds amb la malaltia humana així com a les facilitats de manteniment i manipulació¹⁴⁴.

La soca NOD es va generar per atzar al Japó, al laboratori del Dr. Makino, mentre es desenvolupava un model per l'estudi de les cataractes. Des de que va ser descrit, el model NOD ha estat àmpliament utilitzat en l'estudi de la T1D, ja que els animals desenvolupen insulitis i diabetis de forma espontània, amb una patologia semblant a la que s'observa en humans, amb presència de cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺ autoreactives, limfòcits B productors d'autoanticossos, cèl·lules dendrítiques, macròfags i cèl·lules NK^{145,146}. En aquest model, l'etapa preclínica o insulitis comença de 3 a 6 setmanes d'edat. Aquesta progressa amb el temps i promou la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques, de manera que a les 12-14 setmanes de vida apareixen els primers casos de diabetis insulíndependents. La incidència de T1D en aquests animals és d'aproximadament un 30-40% en mascles i un 60-80% en femelles quan es troben estabulats en condicions SPF. No obstant, aquesta incidència es redueix de manera dràstica quan els ratolins es troben en una sala convencional de l'estabulari, degut a l'exposició a un major nombre de patògens¹⁴⁷.

A partir del model NOD s'han desenvolupat molts ratolins transgènics i knockout per estudiar el sistema immunitari i la seva implicació en diferents malalties autoimmunitàries, com la T1D. Un d'aquests models de ratolí és el ratolí NOD.Rag2^{-/-}, el qual presenta una mutació en homozigosi en el gen Rag2 (de l'anglès, *Recombination Activating Gene-2*). Aquesta alteració provoca un fracàs en la recombinació de les regions V(D)J, de manera que no hi ha maduració de les cèl·lules B i T¹⁴⁸. En conseqüència, i malgrat tenir el fons genètic de susceptibilitat a patir autoimmunitat, els ratolins NOD.Rag2^{-/-} no desenvolupen cap resposta autoimmunitària i, per tant, no pateixen ni insulitis ni T1D.

5. Estudi de la resposta antitumoral: El Càncer

El càncer és un problema de salut important arreu del món i una de les principals causes de morbiditat i mortalitat tant en nens com en adults. El creixement descontrolat de les cèl·lules tumorals dins els teixits normals produeix dany i un deteriorament funcional d'aquests, la qual cosa acaba provocant la mort dels pacients. El fenotip maligne dels càncers es deu principalment als següents factors:

1. Una regulació defectuosa de la proliferació cel·lular que fa que les cèl·lules tumorals es divideixin a una velocitat molt més elevada de l'habitual;
2. La resistència a la mort per apoptosi de les cèl·lules canceroses;
3. La capacitat de les cèl·lules tumorals d'envair i metastatitzar teixits del hoste;
4. La capacitat de les cèl·lules tumorals d'evadir els mecanismes de defensa de l'hoste.

Els tumors es desenvolupen com a resultat d'una complexa desregulació dels gens proto-oncògens, supressors tumorals i de l'estabilitat genòmica, la qual cosa condueix al descontrol del cicle cel·lular i a una immunosubversió. No obstant això, al llarg del temps s'ha demostrat que el sistema immunitari podria controlar una malaltia residual mínima¹⁴⁹ o contribuir a l'èxit terapèutic dels compostos que indueixen la mort de les cèl·lules tumorals⁹⁹.

5.1. Respostes immunitàries enfront a tumors: Vigilància Immunològica

Entre el 1950 i el 1960, Lewis Thomas i Frank McFarlane Burnet van definir el concepte de Immunovigilància o Vigilància Immunològica del càncer. Proposaven que el sistema immunitari té la capacitat de reconèixer i destruir clons de cèl·lules transformades abans que es converteixin en tumors, així com d'eliminar els tumors un cop formats¹⁵⁰. Aquesta teoria s'ha confirmat posteriorment en diversos estudis que demostren un augment de la incidència d'alguns tipus de tumors tant en animals d'experimentació com en pacients immunodeficients¹⁵¹.

El terme microambient tumoral o TME (de l'anglès, *Tumor Microenvironment*) inclou les cèl·lules cancerígenes, la vasculatura associada, la matriu extracel·lular, els fibroblasts..., i també totes les cèl·lules immunitàries reclutades, tant limfoides com mieloides, i tots aquells components moleculars solubles secretats tant per les cèl·lules tumorals com del sistema immunitari. En el TME les cèl·lules més abundants són les d'origen mioeloides, les quals són efectors essencials de la immunitat innata. En individus sans, les seves funcions inclouen la fagocitosi de bacteris exògens (macròfags), el processament i presentació

d'antígens (DCs), la primera resposta a la inflamació (neutròfils) i l'homeòstasi i cicatrització de les ferides (plaquetes). Els factors solubles, com les citocines i les quimiocines, regulen la migració de les cèl·lules mieloides de la medulla òssia a la sang i, finalment, als teixits, inclosos els tumors. Estudis histopatològics han demostrat que molts tumors estan envoltats d'infiltrats de cèl·lules mononuclears formats per limfòcits T i macròfags (TAMs, de l'anglès, *Tumor Associated Macrophages*), així com la presència de limfòcits activats i macròfags en els ganglis limfàtics que drenen els llocs on creix el tumor. De fet, la presència de limfòcits CTL CD8⁺ i Th1 CD4⁺ ha estat prèviament associada a un millor pronòstic¹⁵².

El tumor recluta i modula l'activitat de cèl·lules mieloides endògenes cap a TAMs, DCs, MDSC (de l'anglès, *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) i TANs (de l'anglès, *Tumor-Associated Neutrophils*). En el tumor, aquestes cèl·lules mieloides es mantenen en un estat immadur de diferenciació per tal de desviar-se cap a un fenotip immunosupressor¹⁵³. En els últims anys, s'han desenvolupat nous enfocaments terapèutics per tal de redirigir les cèl·lules mieloides del TME cap a un fenotip més inflamatori que inhibeixi el creixement tumoral. D'aquesta manera, juntament amb els efectors limfoides clàssics (limfòcits T i B), els efectors no clàssics com els macròfags i les DCs podrien contribuir a l'eradicació del tumor. A banda de la seva funció com a APCs per promoure una resposta immunitària adaptativa contra els tumors, s'ha descrit que algunes DCs poden actuar com a cèl·lules efectores innates tumoricides. Aquest subconjunt de cèl·lules es coneixen com a *Natural Killer Dendritic Cells* o NKDCs, les quals expressen totes les proteïnes necessàries per a una activitat citotòxica. A més a més, les cèl·lules tumorals o llits tumorals poden proporcionar estímuls a les DCs infiltrants de tumors, com ara lligands NKG2D, IFN tipus I o CD40L, que se sap que milloren l'activitat citotòxica de les DCs¹⁵⁴. Alguns compostos derivats del tumor (com el òxid nítric [NO] o el *Tumor Growth Factor* β [TGF- β]) també estimulen les cèl·lules mieloides. El NO, per exemple, pot sensibilitzar a les cèl·lules tumorals a una mort dependent de Fas promoguda per les DCs¹⁵⁵. Diversos articles han descrit nous subconjunts de NKDCs (CD11c⁺NK1.1⁺), com les *Interferon-producing Killer Dendritic Cells* o IKDCs (CD3⁻ CD19⁻ CD11c^{dim} B220⁺ NK1.1⁺ CD49b⁺ Gr1⁻), les quals s'ha vist que tenen un paper important en la inhibició de la progressió tumoral^{156,157}.

Malgrat tot, amb freqüència, les respostes immunitàries no poden prevenir el creixement dels tumors. Les principals causes d'això són:

1. Capacitat immunogènica dèbil del tumor (manca d'antígens específics de tumor).
2. La capacitat de creixement i de disseminació del tumor supera la resposta immunitària.
3. Molts tumors tenen mecanismes especialitzats per escapar la resposta immunitària.
4. Existència de respostes supressores per part del propi sistema immunitari.

5.1.1. Antígens tumorals

Per tal de ser reconegudes pel sistema immunitari, les cèl·lules tumorals han d'expressar antígens tumorals. Tant en humans com en altres espècies animals s'han identificat antígens tumorals que poden ser reconeguts per limfòcits T i B de manera que s'indueix una resposta immunitària antitumoral, ja sigui de manera natural, o bé, mitjançant vacunes¹⁵⁸. Actualment, s'han identificat dos tipus d'antígens tumorals: els Antígens Específics de Tumor o TSAs (de l'anglès, *Tumor-Specific Antigens*) i els Antígens Associats a Tumor o TAAs (de l'anglès, *Tumor-Associated Antigens*)¹⁵⁹. Els **TSAs** són molècules que les cèl·lules sanes no produeixen i que, per tant, no han passat per un procés de tolerància immunitària. S'originen per mutacions en algun gen, o bé per la incorporació d'un virus oncogènic. Els **TAAs**, en canvi, són molècules proteiques expressades per les cèl·lules tumorals que poden ser immunogèniques però que també poden estar presents en cèl·lules sanes. Es poden diferenciar diversos tipus de TAAs segons el seu patró d'expressió en teixits sanes: els antígens sobreexpressats, els antígens de diferenciació i els antígens CGA (de l'anglès, *Cancer-Germinal Antigens*)¹⁶⁰. Els antígens sobreexpressats són aquells que els seus nivells d'expressió són més elevats en les cèl·lules tumorals que en les cèl·lules sanes¹⁶¹, arribant al llindar del reconeixement de cèl·lules T per trencar la tolerància immunològica i provocar una resposta anticancerígena. Her-2/neu i p53 són els TAAs més reconeguts i estudiats d'aquesta categoria¹⁶². El segon grup són els antígens de diferenciació de teixits, els quals són compartits pels tumors i el teixit sa d'origen. Un exemple són els antígens de diferenciació de melanòcits o MDAs (de l'anglès, *Melanocyte Differentiation Antigens*). Es tracta de proteïnes normals no mutades expressades exclusivament en melanomes i melanòcits normals en diferents etapes de diferenciació, que intervenen en els passos enzimàtics de la melanogènesi^{163,164}. Els MDAs s'expressen molt en la majoria dels melanomes primaris i metastàtics^{164,165}. Aquests antígens inclouen la tirosinasa, les proteïnes relacionades amb la tirosinasa (TRP-1 i TRP-2), l'antigen dels

melanòcits (melan-A/MART-1) i la glicoproteïna 100 (gp100)^{160,163-165}. Per últim, existeixen els antígens CGA, l'expressió dels quals es troba restringida als teixits reproductius immunoprivilegiats, on no són reconeguts pel sistema immunitari. Aquests antígens s'expressen en diversos tipus de càncer, esdevenint la diana del sistema immunitari. El primer CGA identificat va ser MAGE-1 (de l'anglès, *Melanoma Associated Antigen 1*), el qual s'expressa en cèl·lules de les línies germinals, concretament als testicles, i es troba sobreexpressat en melanomes i carcinomes.

Diversos estudis han demostrat que els sèrums de pacients amb càncer contenen anticossos que reaccionen amb TAAs¹⁶⁶. Els tipus de proteïnes cel·lulars que indueixen aquestes respostes d'autoanticossos són força variades i els factors que indueixen la seva producció no han estat del tot definits. Aquests antígens tumorals específics poden ser útils per al diagnòstic de certs tipus tumorals, però també es poden utilitzar per a ajudar a l'organisme a produir una resposta immunitària contra les cèl·lules canceroses, ja sigui dirigint la teràpia contra aquests TSAs o utilitzant immunoteràpies no específiques per ajudar a reforçar el sistema immunitari a destruir les cèl·lules canceroses.

5.2. Evasió de la resposta immunitària per part dels tumors

Malgrat el sistema immunitari és capaç de reconèixer i destruir les cèl·lules cancerígenes més immunològicament vulnerables perquè presenten antígens tumorals, la inestabilitat genètica dels tumors pot generar cèl·lules tumorals variants amb una menor immunogenicitat. La pèrdua d'expressió de TSAs fa que aquestes es tornin invisibles per al sistema immunitari. La selecció d'aquests clons es coneix amb el concepte d'edició tumoral o immunoselecció¹⁶⁷. És en aquest moment que es produeix l'escapament del tumor, que provoca un càncer clínic evident. Aquesta evasió del sistema immunitari també pot ser deguda a la presència de molècules co-inhibidores, com PD-L1, MHC-II o Galectina-9 que uneixen respectivament PD-1, LAG-3 i TIM-3, presents en els CTLs^{167,168}. Aquestes unions inhibeixen l'activitat citotòxica dels limfòcits T CD8⁺, protegint a les cèl·lules tumorals de la seva eliminació. Aquesta tolerància immunològica també és causada en part degut a que la majoria d'antígens tumorals són antígens propis i això fa que no s'activin les APCs i no s'indueixi una resposta de CTLs potent¹⁶⁷. A més a més, malgrat que el sistema immunitari de l'hoste sigui capaç de generar una bona resposta contra les cèl·lules canceroses, a vegades els tumors perden la sensibilitat a les citocines proinflamatòries com el TNF- α o els IFNs, evitant així la inducció d'estrès i la seva mort.

Els tumors també poden utilitzar al seu favor elements de la resposta immunitària, com les quimiocines angiogèniques secretades pels macròfags presents en el TME¹⁶⁸.

A banda dels mecanismes que indueixen defectes i disfunció de la resposta immunitària contra el tumor, el procés d'evasió de la resposta immunitària pot incloure factors adversos presents en el TME entre els quals destaquen: la presència de factors tolerogènics humorals, és a dir, la presència de factors immunosupressors intratumorals com ara IDO, TGF- β , PGE2, o la IL-6^{167,168}; la presència de factors tolerogènics cel·lulars, és a dir, la presència de cèl·lules amb accions immunosupressores infiltrant el tumor com ara Tregs, MDSCs, Macròfags M2 o DCs tolerogèniques^{167,168}; l'existència d'esgotament metabòlic que impedeix l'acció citotòxica dels CTL¹⁶⁸; i l'existència de desestructuració de la matriu extracel·lular tumoral que impedeix la migració dels CTLs cap al tumor i d'aquesta manera s'impedeix la seva activitat citolítica i la destrucció de les cèl·lules tumorals.

5.3. Immunoteràpia contra el càncer

El concepte que el sistema immunitari pot reconèixer i controlar el creixement del tumor es remunta al any 1893 quan William Coley va utilitzar bacteris vius com a estimulant immunitari per tractar el càncer. Degut a l'elevada mortalitat que comportaven aquests tractaments, William Coley va generar un preparat compost *per Streptococcus pyogenes* i *Serratia marcescens* inactivats per calor, el qual es coneix actualment com a Toxina de Coley. La teràpia de Coley consistia en l'administració mínima de dues o tres dosis de la toxina a la setmana durant mesos amb l'objectiu de provocar una febre perllongada en el temps al pacient. D'un total de 170 casos amb càncer de diferents etiologies tractats aplicant aquesta teràpia, Coley va aconseguir un 64% de remissions i una supervivència del 45% als 5 anys. La Teràpia de Coley va perdre interès, però, degut a les dificultats d'estandarditzar el tractament, als mecanismes d'acció desconeguts, els possibles riscos d'infecció i a l'inici d'una nova era en el tractament del càncer amb radioteràpia. En les darreres dècades, però, degut a l'enorme progrés en la comprensió de com el càncer eludeix el sistema immunitari, aquesta ha tornat a prendre rellevància i, actualment, existeixen diferents tipus d'immunoteràpies a nivell clínic. La teràpia de Coley és, de fet, la base de l'actual tractament de la neoplàsia de bufeta urinària amb la BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*), així com del tractament amb Imiquimod.

La immunoteràpia antitumoral té com a objectiu potenciar la resposta immunitària dèbil, ja sigui de manera passiva, amb l'administració d'anticossos o limfòcits T específics de

tumor, o activa, per exemple amb vacunes. Els tractaments contra el càncer efectius, segurs i duradors constitueixen els principals reptes de les ciències mèdiques, i la immunoteràpia contra el càncer és un dels enfocaments més atractius per provocar una immunitat protectora antitumoral de llarga durada. A continuació, es fa una breu revisió de les immunoteràpies actuals.

5.3.1. Virus oncolítics

Dècades després dels experiments de Coley, es van inventar teràpies oncolítics de virus, que aprofiten els virus modificats genèticament per infectar cèl·lules tumorals i, per tant, estimulen un entorn proinflamatori per augmentar la immunitat sistèmica antitumoral. Amb els avenços en enginyeria genètica i tecnologies de transformació de virus, les teràpies oncolítics de virus han avançat molt en els darrers anys. En particular, el talimogen laherparepvec (T-Vec), també conegut com Imlygic, un virus de l'herpes simplex modificat genèticament, demostra avantatges clínics impressionants per als pacients amb melanoma avançat i ha estat aprovat per al tractament del melanoma metastàtic no resecable¹⁶⁹.

5.3.2. Vacunes terapèutiques contra el càncer

Les vacunes terapèutiques són un tipus d'immunoteràpia activa contra el càncer. Tenen com a objectiu tractar al pacient mitjançant l'ús del seu propi sistema immunitari fent que aquest s'activi i generi un atac contra les cèl·lules cancerígenes. Les vacunes contra el càncer estan dissenyades per induir *in vivo* la immunoreactivitat específica del tumor o reactiva al tumor. Existeixen diferents tipus de vacunes antitumorals, com les vacunes amb antígens tumorals, vacunes amb ADN o, més recentment, utilitzant DCs incubades amb antígens tumorals.

Les més comuns són les vacunes basades en pèptids, els quals són epítops immunògens derivats de TSAs o TAAs¹⁷⁰. S'acostumen a administrar en combinació amb coadjuvants per tal d'augmentar l'eficàcia del sistema immunitari i que, finalment, les vacunes acabin desencadenant respostes immunitàries antitumorals mediades, majoritàriament, per cèl·lules T. En el cas de les vacunes contra l'ADN, s'administren al pacient plàsmids que contenen ADNc que codifiquen antígens tumorals perquè el pacient comenci a expressar aquests antígens i proporcionin immunitat i resposta de les cèl·lules T contra ells¹⁷⁰.

A banda dels antígens tumorals, la vacunació basada en DCs també ha demostrat resultats clínics significatius. Les DCs són APCs que tenen un paper crític en provocar immunitat antitumoral. Després de la seva activació per antígens tumorals, les DCs poden interioritzar,

processar i presentar els epítops processats a les cèl·lules T per tal d'induir una resposta T citotòxica. Les vacunes basades en DCs consisteixen en la reinfusió de DCs aïllades del pacient i tractades *ex vivo* amb antígens tumorals o lisats de cèl·lules tumorals i estimulats amb un còctel de maduració definit¹⁷¹. Un exemple representatiu d'una vacuna terapèutica contra el càncer basada en DCs és Sipuleucel-T (Provenge™), aprovada per la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) el 2010 per al tractament del càncer de pròstata avançat¹⁶⁹.

Finalment, també es poden utilitzar cèl·lules tumorals senceres per evocar respostes immunitàries espontànies. GVAX és una vacuna contra el càncer composta de cèl·lules tumorals autòlogues modificades genèticament per segregar GM-CSF. Aquesta va mostrar una promesa en augmentar les respostes immunitàries específiques del tumor en múltiples tipus de càncer¹⁶⁹.

5.3.3. Citocines

Funcionant com a missatgers per orquestrar les interaccions cel·lulars i les comunicacions del sistema immunitari, les citocines són alliberades en resposta a les tensions cel·lulars com la infecció, la inflamació i la tumorigènesi. Les citocines secretades permeten la ràpida i eficient propagació de la senyalització immunitària, per tal de generar respostes potents i coordinades contra els antígens diana. Una teràpia amb citocines típica és la teràpia amb IL-2. Aquesta citocina té la capacitat d'expandir els limfòcits T *in vitro* i *in vivo* i, per tant, té propietats immunoestimuladores¹⁷². Una altra citocina terapèutica clàssica en el tractament del càncer és l'IFN- α , el qual té funcions polivalents en el control del tumor, inclosa l'eradicació directa cèl·lules tumorals mitjançant la inducció de senescència i apoptosi i l'augment de respostes immunitàries antitumorals efectives mitjançant l'estimulació de la maduració de DCs i la millora de la citotoxicitat de les cèl·lules T¹⁷². Malgrat ambdues citocines tenen beneficis clínics clars en el tractament del càncer, la poca tolerabilitat i l'elevada toxicitat dificulten les aplicacions d'aquestes citocines com a monoteràpies. Tot i així, les citocines encara s'estan investigant en combinació amb altres immunoteràpies, com la teràpia de transferència de cèl·lules adoptives, per eludir aquests impediments.

5.3.4. Teràpia cel·lular adoptiva

La teràpia cel·lular adoptiva o ACT (de l'anglès, *Adoptive cell therapy*) es basa en l'administració al pacient de cèl·lules immunològicament actives amb la finalitat de tractar o prevenir el desenvolupament del tumor. L'ACT consisteix en l'obtenció de cèl·lules

immunitàries de la sang perifèrica o del propi tumor del pacient, la replicació i l'activació *ex vivo* de les cèl·lules immunitàries específiques de tumor i la reinfusió de les cèl·lules T activades al pacient^{173,174}.

El 1988, Steven Rosenberg, va publicar els resultats del primer tractament amb transferència adoptiva de limfòcits T infiltrants a tumors (TILs), el qual era efectiu en pacients amb càncer metastàtic¹⁷⁵. Més endavant, la transferència adoptiva de limfòcits T tumorreactius seleccionats va conduir a l'ús de cèl·lules T manipulades genèticament per a dirigir-se contra neoantígens específics de tumor. Actualment, existeixen dos tipus de cèl·lules T modificades genèticament amb eficiència en el tractament de tumors malignes: les cèl·lules T de receptor d'antigen quimèric o cèl·lules CAR-T (de l'anglès, *Chimeric Antigen Receptor T Cells*), i les cèl·lules T amb TCR modificat o *TCR-engineered T Cells*.

Les teràpies CAR-T són les més conegudes i es basen en l'ús de les cèl·lules T d'un pacient, obtingudes a partir de la sang perifèrica. Una vegada aïllats, els limfòcits T es modifiquen genèticament per tal que expressin uns receptors quimèrics específics d'antígens tumorals. Un cop modificats, els limfòcits s'expandeixen *in vitro* per a, posteriorment, reinfundir-los al pacient¹⁶⁹. És gràcies a aquest receptor d'antigen quimèric que aquestes cèl·lules T “modificades” poden reconèixer els antígens en la membrana citoplasmàtica de les cèl·lules tumorals i matar-les. Aquests limfòcits també expressen molècules coestimuladores com CD28 per tal que les cèl·lules CAR-T puguin persistir i romandre actives en el pacient.

5.3.5. Immunoteràpia amb anticossos monoclonals

Els anticossos monoclonals o mAbs (de l'anglès, *monoclonal Antibodies*) són un tipus d'immunoteràpia passiva que consisteix en la transferència al pacient d'anticossos antitumorals humanitzats. Aquests mAbs poden induir la mort de la cèl·lula tumoral mitjançant toxicitat cel·lular mitjançada per anticossos. A més a més, els mAbs poden estar conjugats a toxines o isòtops radioactius (immunotoxines) de manera que, quan fan diana, l'anticòs s'endocita i la toxina o el isòtop destrueixen la cèl·lula. En la taula 3 s'hi troben resumits alguns dels anticossos monoclonals aprovats actualment per la FDA per al tractament de càncer en humans.

Taula 3. Anticossos monoclonals aprovats actualment per al tractament de diferents tipus de cancer.

Nom del tractament	Tractament contra...	Diana terapèutica	Any aprovat
Rituximab	Limfoma No-Hodgkin	CD20	1997
Tositumomab *			2002
Ibritumomab tiuxetan*			2003
Trastuzuman	Càncer de mama	ERB-2	1998
Gemtuzuman ozogamicin*	Leucèmia mielítica aguda	CD33	2000
Alemtuzumab	Leucèmia limfocítica crònica	CD52	2001
Cetuximab	Càncer colorectal	EGFR	2004
	Càncer de cap i coll		2006
Bevacizumab	Càncer colorectal	VEGF-A	2004

* anticossos monoclonals conjugats.

5.3.6. Immunoteràpia amb bloquejants de punts de control

Dins de l'ús dels anticossos monoclonals humanitzats, una de les immunoteràpies actualment més utilitzades és l'ús d'anticossos que bloquegen vies inhibidores per afavorir la immunitat antitumoral.

Com ja s'ha esmentat, el sistema immunitari té la capacitat de reconèixer i matar selectivament els patògens o cèl·lules no saludables, incloses les cèl·lules cancerígenes, orquestrant una resposta immune coordinada que inclou respostes innates i adaptatives. Molts punts de control (o *checkpoints*, en anglès), és a dir, l'acció d'aquestes vies inhibidores, asseguren que les cèl·lules del sistema immunitari no destrueixen erròniament les cèl·lules sanes durant una resposta immune, evitant així fenòmens d'autoimmunitat. Les cèl·lules cancerígenes poden explotar aquests punts de control immunitaris com una forma d'evadir la detecció per part del sistema immunitari i la seva conseqüent eliminació. En bloquejar les proteïnes del punt de control immunitari, incloses PD-1, PD-L1 i CTLA-4, amb anticossos monoclonals, el sistema immunitari pot superar la capacitat del càncer de resistir les respostes immunitàries i estimular els propis mecanismes del cos per mantenir-se efectius en les seves defenses contra el càncer.

El receptor **PD-1** s'expressa a la superfície de les cèl·lules T activades. Els seus lligands, PD-L1 i PD-L2, s'expressen a la superfície de cèl·lules dendrítiques o macròfags. La interacció PD-1/PD-L1 garanteix que el sistema immunitari només s'activi en el moment adequat per minimitzar la possibilitat d'inflamació autoimmune crònica. La via PD-1/PD-L1 representa un mecanisme adaptatiu de resistència immune exercit per les cèl·lules

tumorals en resposta a l'activitat immune antitumoral endògena. El PD-L1 s'expressa excessivament en cèl·lules tumorals o en cèl·lules no transformades del TME¹⁷⁶. El PD-L1 expressat a les cèl·lules tumorals s'uneix als receptors PD-1 de les cèl·lules T activades, cosa que condueix a la inhibició de les cèl·lules T citotòxiques (figura 8). Aquestes cèl·lules T desactivades romanen inhibides en el microambient tumoral.

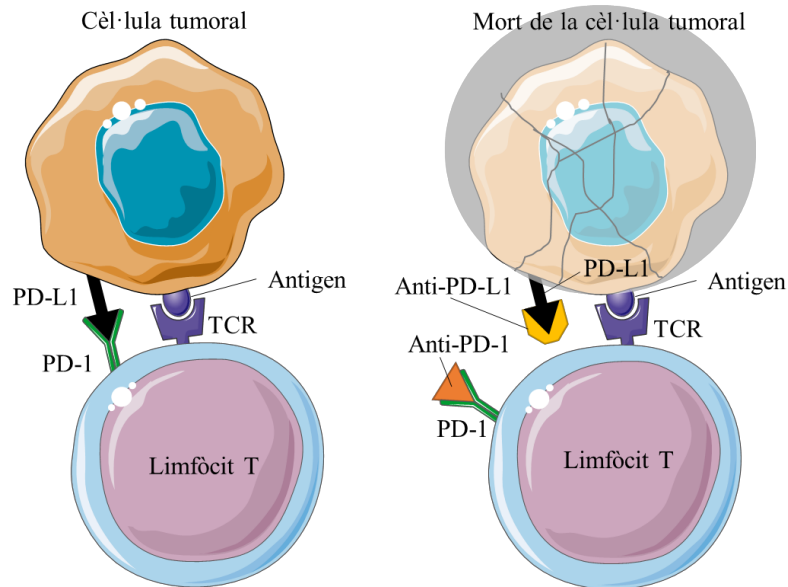


Figura 8. Mecanisme d'acció dels inhibidors de punts de control immunitari tipus PD-1/PD-L1. Les proteïnes del punt de control, com la PD-L1 a les cèl·lules tumorals i la PD-1 a les cèl·lules T, ajuden a controlar les respostes immunes. La unió de PD-L1 a PD-1 impedeix que les cèl·lules T matin a les cèl·lules tumorals del cos (esquerra). El bloqueig de la unió de PD-L1 a PD-1 amb un inhibidor del punt de control immunitari (anti-PD-L1 o anti-PD-1) permet que les cèl·lules T matin les cèl·lules tumorals (dreta).

Actualment, s'utilitzen de manera rutinària teràpies d'anticossos monoclonals contra PD-1 i PD-L1 com ara el Nivolumab (anti-PD-1), aprovat per al melanoma metastàtic i el càncer de pulmó cèl·lules petites no escamoses; o el Pembrolizumab, desenvolupat per Merck i aprovat per al melanoma metastàtic.

El **CTLA-4** (de l'anglès *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*) és un membre de la família B7/CD28 que inhibeix les funcions de les cèl·lules T. S'expressa constitutivament en Tregs, malgrat també s'expressa de manera regulada en altres subconjunts de cèl·lules T, especialment cèl·lules T CD4⁺, quan s'activen¹⁷⁷. El CTLA-4 media la immunosupressió disminuint indirectament la senyalització a través del receptor coestimulador CD28. El CTLA-4 pot actuar com un mecanisme de regulació immunitària reduint directament la capacitat de les APCs d'estimular als limfòcits T mitjançant CD28. Tot i que ambdós receptors s'uneixen a CD80 i CD86, CTLA-4 ho fa amb una afinitat molt superior, superant

efectivament el CD28. CTLA-4 també pot eliminar CD80 i CD86 (inclosos els seus dominis citoplasmàtics) de les superfícies cel·lulars de les cèl·lules que presenten antigen mitjançant transendocitosis, reduint per tant la disponibilitat d'aquests receptors estimuladors a altres cèl·lules T que expressen CD28. Al limitar la senyalització mediada per CD28 durant la presentació de l'antigen, CTLA-4 augmenta el llindar d'activació de les cèl·lules T, reduint les respostes immunes a antígens febles com els antígens propis i tumorals (figura 9)¹⁷⁷.

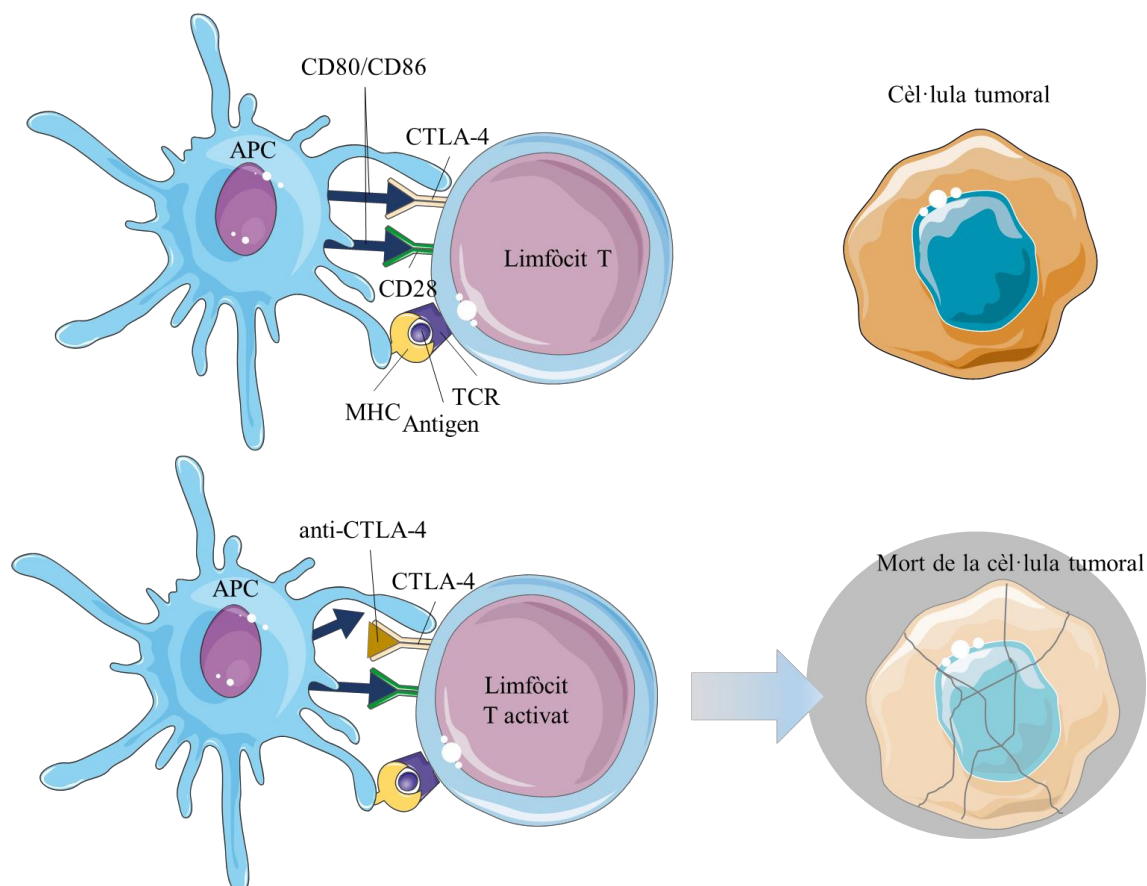


Figura 9. Mecanisme d'acció dels inhibidors de punts de control immunitari per la via CTLA-4. Les proteïnes de punts de control, com B7-1/B7-2 en les cèl·lules presentadores d'antigen i CTLA-4 en les cèl·lules T, ajuden a mantenir sota control les reaccions immunitàries. Quan el TCR s'uneix a l'antigen i a les proteïnes del MHC de les APC i CD28 s'uneix a B7-1/B7-2, és possible que s'activi la cèl·lula T. No obstant, la unió de B7-1/B7-2 amb CTLA-4 manté les cèl·lules T inactives de manera que no poden destruir les cèl·lules tumorals (dalt). El bloqueig de la unió de B7-1/B7-2 amb CTLA-4 amb un inhibidor de punts de control (anticòs anti-CTLA-4) permet que la cèl·lula T s'activi i destrueixi les cèl·lules tumorals (baix).

Ipilimumab, és un anticòs monoclonal contra CTLA-4 i constitueix el primer anticòs dirigit contra cèl·lules immunes aprovat per la FDA dels EUA per a la immunoteràpia contra el càncer. Aquesta té molts més efectes secundaris i per això el seu us en clínica és més limitat.

5.4. Pèptids penetrants a tumors

Un dels principals problemes en els tractaments antitumorals és la poca penetració d'aquests en el parènquima del tumor, la qual cosa fa que tinguin una baixa eficàcia terapèutica així com diversos efectes adversos. Per tal de solucionar aquesta problemàtica, en els darrers anys, han pres rellevància els compostos que reconeixen selectivament molècules diana en tumors i que, per tant, poden facilitar el lliurament d'agents diagnòstics i terapèutics als tumors. Aquestes molècules diana es troben tant en els vasos sanguinis tumorals com en les pròpies cèl·lules tumorals i les cèl·lules estromals del tumor. Alguns exemples inclouen certes integrines, dipòsits de fibrina i antígens tumorals, com ara l'antigen de membrana específic de la pròstata (PSMA) i l'antigen carcinoembrionari (CEA)¹⁷⁸. Els compostos utilitzats per a dirigir els tractaments al lloc del tumor poden ser, anticossos, pèptids o bé, lligands naturals d'un receptor altament expressats en tumors (com el receptor del folat). Aquests compostos fan que el fàrmac al qual es troben units s'acumuli preferentment en el tumor, la qual cosa dona lloc a una major activitat d'aquest així com a menys efectes secundaris.

En els darrers anys, s'ha vist que un pèptid penetrant de tumor o TPP (de l'anglès, *Tumor Penetrating Peptide*) anomenat iRGD es pot utilitzar de manera eficaç per a alliberar els fàrmacs en els tumors. El pèptid iRGD es dirigeix als tumors i s'hi acumula mitjançant un procés de 3 passos (figura 10): en primer lloc, el motiu RGD (seqüència Arg-Gly-Asp) s'uneix a les integrines $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$, que s'expressen específicament als vasos de nova formació presents en els tumors i en cèl·lules tumorals. En segon lloc, una proteasa trenca el pèptid cíclic, exposant així el motiu CendR (R/KXXR/K) de iRGD. Aquesta proteasa no s'ha identificat, però és probable que sigui una furina o un enzim similar a la furina perquè CendR és un motiu de reconeixement preferit per a aquestes proteases. En principi, qualsevol proteasa que talli després d'un residu bàsic podria activar iRGD. En tercer lloc, el motiu CendR s'uneix a la neuropilina-1 (NRP1) o a la neuropilina-2 (NRP2), i la interacció activa una via de transport anomenada via CendR^{179,180}, que permet el transport dels fàrmacs cap a l'interior dels tumors i afavoreix una penetració més profunda d'aquests en el teixit, millorant-ne la seva eficàcia terapèutica¹⁸⁰.

Existeixen dues estratègies per a utilitzar la tecnologia iRGD per a millorar la eficàcia dels tractaments contra el càncer: la unió covalent de iRGD amb el tractament o amb vehicles de lliurament de fàrmacs (com els liposomes), i la coadministració d'ambdós compostos sense estar units física o químicament entre ells. S'ha vist que ambdues estratègies milloren

significativament la penetració de fàrmacs en el tumor així com l'eficàcia d'aquests^{181,182} i la reducció de la toxicitat. Els fàrmacs dirigits amb iRGD inclouen quimioteràpics convencionals (doxorubicina¹⁸³, gemcitabina¹⁸⁴), inhibidors de la tirosina quinasa¹⁸⁵, anticossos antitumorals^{186,187} i fàrmacs de nanopartícules^{188,189}.

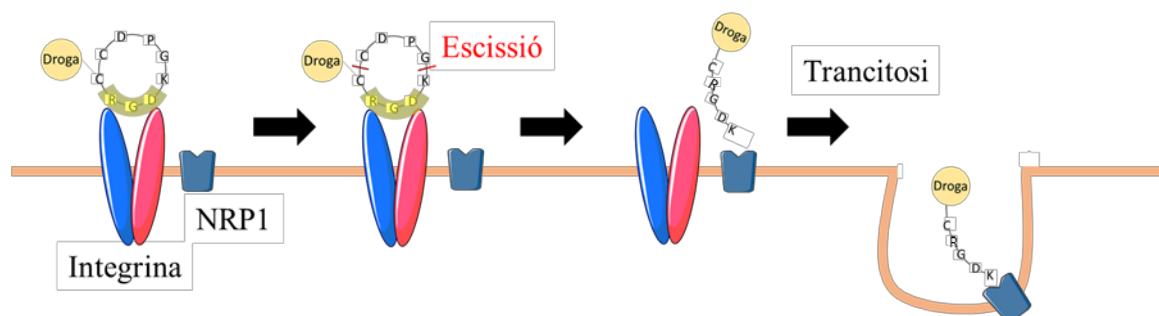


Figura 10. Mecanisme d'acció del pèptid iRGD. El pèptid iRGD conté una seqüència Arg-Gly-Asp que es pot unir a les integrines ($\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$) expressades a la superfície de les cèl·lules tumorals així com en els vasos de neoformació, molt abundants en els tumors. Un cop unit, el pèptid pateix una escissió que exposa el seu motiu CendR a l'extrem C-terminal. És aquest motiu el que s'uneix a NRP1 (neuropilina 1) desencadenant l'entrada del pèptid iRGD, juntament amb allò que porti unit, a l'interior de les cèl·lules tumorals.

6. Mastocitoma

Un mastocitoma és un tumor derivat d'un mastòcit que s'ha malignitzat. Els mastòcits deriven de les cèl·lules mare mieloides i es localitzen en teixits connectius, principalment en la pell i els revestiments de les mucoses. Els mastòcits tenen una funció important en la resposta del sistema immunitari enfront certs bacteris i paràsits i d'altres patògens. Els grànuls citoplasmàtics dels mastòcits estan farcits d'histamina, heparina, i enzims proteolítics, els quals tenen un paper actiu en les respostes immunitàries contra aquests patògens, però també en les reaccions al·lèrgiques i anafilàctiques. A més a més, quan s'activen, els mastòcits secreten citocines que promouen les respostes de tipus Th2.

La proliferació clonal de mastòcits neoplàsics pot donar lloc a manifestacions tant locals com sistèmiques que es coneixen amb el nom de mastocitosi. Els mastocitomes cutanis són una forma de mastocitosi cutània que es caracteritzen per la presència d'una o diverses màcules, plaques o nòduls hiperpigmentats associats a una acumulació anormal de mastòcits en la pell. La mastocitosi cutània local sol afectar a nens menors de 2 anys¹⁹⁰. La prevalença és desconeguda, però els mastocitomes són la segona forma més freqüent de mastocitosi cutània en nens, i suposa un 10-15% dels casos. El pronòstic per a pacients pediàtrics és molt bona. La majoria de les lesions regressen durant la infància, essent inexistents ja en l'adolescència. S'han descrit pocs casos de mastocitoma en adults, però en aquests la recuperació espontània és molt menys comú. El tractament del mastocitoma és simptomàtic i inclou l'administració oral d'antihistamínics, esteroides tòpics i l'ús d'apòsits hidrocol·loides per a cobrir les lesions. Als pacients amb lesions simptomàtiques alarmants que no responen a altres formes de tractament es recomana l'excisió quirúrgica del mastocitoma.

L'etiologia de la malaltia no està del tot clara, però es creu que el microambient del teixit lesionat presenta una major concentració de factors de creixement i interleucines que promouen la proliferació dels mastòcits i els melanòcits i inhibeixen l'apoptosi dels mastòcits. S'han identificat mutacions en el gen KIT en alguns pacients amb mastocitosi cutània¹⁹¹. La mutació més comú de C-KIT és la D816V, la qual es troba tant en adults com en infants¹⁹². Tot i així, aquesta mutació és rara en la població pediàtrica i l'etiologia i patogènesi del mastocitoma està encara per determinar.

6.1. Model muri d'elecció de mastocitoma: Línia de mastocitoma P815 en la soca de ratolí singènica DBA/2N.

La línia cel·lular P815 és una línia cel·lular de mastocitoma derivada del tractament amb metilcolantè d'un ratolí DBA/2N mascle. La injecció subcutània de cèl·lules de la línia P815 en ratolins DBA/2N singènics indueix el creixement ràpid i local de tumors sòlids. Aquest model ha estat molt útil al llarg de les dècades per a estudiar i entendre la relació entre el tumor i la resposta antitumoral de l'hoste.

6.1.1. Antígen específic de tumor: P1A

S'han identificat almenys cinc antígens tumorals expressats per cèl·lules P815 *wild type* segons el reconeixement per clons CTL individuals. En el mastocitoma P815 s'expressa el gen P1A, el qual codifica per als antígens P815A i B, que poden ser reconeguts pels CTLs dels ratolins DBA/2N si s'indueix una resposta específica contra ells. El P1A va ser el primer TSA identificat en mamífers. Aquest gen s'activa en diversos tumors, però és silenciós a les cèl·lules normals, excepte els trofoblasts placentaris i les cèl·lules germinals masculines. Com que aquestes cèl·lules no presenten MHC-I en la seva superfície, no són capaces de presentar l'antigen. Per tant, la immunització contra aquest antigen no indueix efectes secundaris autoimmunes¹⁹³. P815A comparteix moltes característiques amb antígens tumorals humans de tipus MAGE¹⁹⁴, la qual cosa posa de manifest la rellevància del model de tumoral del mastocitoma P815 per a aplicacions futures de la immunoteràpia en humans. Un segon antigen tumoral, anomenat P1E, ha estat clonat més recentment, cosa que permet controlar les respostes immunes contra dos pèptids de classe I restringits per MHC simultàniament.

7. Melanoma Cutani

El melanoma cutani és un tumor maligne que s'origina als melanòcits de la pell. Els melanòcits són unes cèl·lules especialitzades que es troben en la membrana basal de l'epidermis i s'encarreguen de produir la melanina, un pigment que es troba a la pell, ulls i cabell i la funció del qual és bloquejar els rajos UV solars per tal d'evitar que danyin el ADN cel·lular. La majoria de melanomes s'originen als melanòcits de la pell i és per això que es coneixen com a melanomes cutanis. Existeixen, però, altres tipus de melanoma com el melanoma ocular (originat a l'iris o a la coroides), el melanoma de mucoses (originat a les mucoses anorectal, genital, oral, nasal, etc.) o els melanomes de glàndula suprarenal, meninges o primari ganglionar, malgrat amb una freqüència molt menor.

7.1. Incidència, epidemiologia i factors de risc del melanoma

La incidència i mortalitat del melanoma han anat augmentant de forma progressiva durant les últimes dècades. A Espanya, la incidència és de 9,7 malalts per cada 100.000 persones. D'acord amb la Societat Espanyola d'Oncologia, el melanoma representa només el 4% de tots els càncers de pell malignes. Tot i així, és el causant del 80% de morts per aquests tipus de càncer. A diferència d'altres tipus de càncers de pell, el melanoma és un tumor amb una clara tendència a produir metàstasis per via limfàtica o hemàtica, de vegades precoçment. Per a pacients amb un melanoma localitzat, el pronòstic sol ser bo després d'una escissió quirúrgica del tumor. Malauradament, el melanoma metastàtic és molt resistent a les teràpies actuals. Després de la cirurgia, els pacients d'alt risc (estadis IIB, IIC i III) tenen taxes de recaiguda del 50-80%.

Els factors de risc del melanoma inclouen tant factors intrínsecs (genètica i fenotip) com extrínsecs (ambientals o d'exposició). Entre ells destaquen l'exposició als raigs UV solars, les característiques pigmentàries de l'individu, la història familiar de melanoma, estats d'immunosupressió i factors ambientals diversos. Evidències epidemiològiques suggereixen que la exposició a radiacions UV així com la sensibilitat de l'individu a aquesta radiació són factors de risc del càncer de pell^{195,196}. A més a més, el sistema immunitari pot jugar un paper important en la seva patogènesi. De fet, els pacients immunodeprimits tenen un elevat risc de desenvolupar càncer de pell¹⁹⁷.

Es tracta, per tant, d'un tipus de càncer que afecta majoritàriament a gent jove i de mitjana edat, que metastatitza amb facilitat i, a més a més, és altament resistent als tractaments antineoplàsics convencionals.

7.2. Estratificació i pronòstic del melanoma cutani

Un cop generat el melanoma, aquest passa per diferents etapes abans d'arribar a fer metàstasi (figura 11). La *American Joint Cancer Commission*¹⁹⁸ utilitza un sistema d'estadificació del melanoma anomenat sistema TNM (de l'anglès, *Tumor-Node-Metastasis*). Es basa en la utilització de les següents dades clíniques i histològiques:

- **T.** Característiques del tumor: gruix, presència o no d'ulceració, nombre de mitosis per mm².
- **N.** Presència de ganglis regionals limfàtics afectats.
- **M.** Presència o no de metàstasi a distància i nivells de LDH (lactat deshidrogenasa) en sèrum.

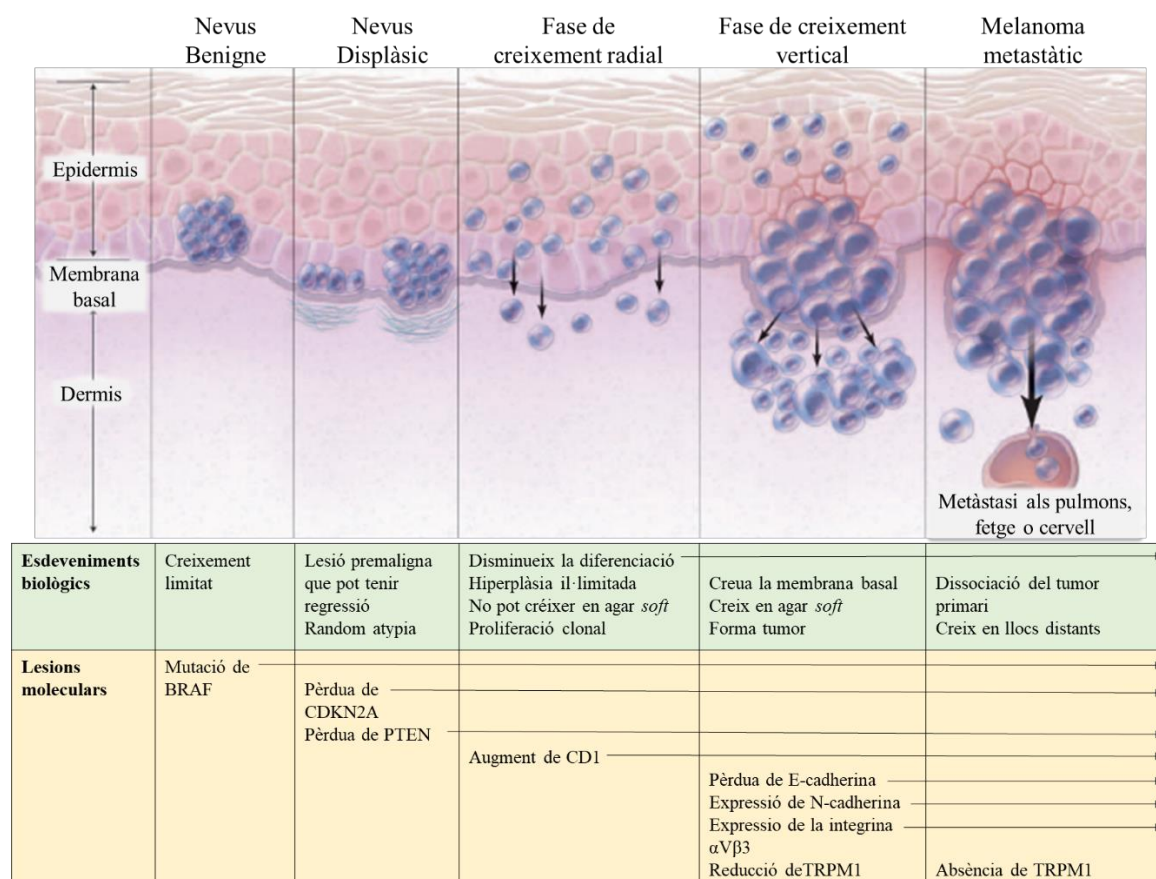


Figura 11. Progressió del melanoma cutani. Conjunt d'esdeveniments biològics i moleculars que es donen en la progressió del melanoma cutani.

D'aquesta manera, es poden classificar els melanomes en els diferents estadis clínics, de menor a major malignitat:

- Estadi 0. Melanoma *in situ*, sense metàstasi regionals ni distants.

- Estadi I. Els tumors poden ser de fins a 1 mm, amb o sense ulceració, o bé d'entre 1 i 2 mm sense ulcerar. Els pacients no presenten metàstasis regionals ni distants. Es poden subdividir, de menys a més maligne, en els subestadis IA i IB.
- Estadi II. Els tumors són melanomes ulcerats d'entre 1 i 2 mm; d'entre 2 i 4 mm, amb o sense ulceració; o bé, majors de 4 mm però sense ulcerar. Els pacients no presenten metàstasis regionals ni distants. Es poden subdividir, de menys a més maligne, en els subestadis IIA, IIB i IIC.
- Estadi III. Aquest estadi es caracteritza per la presència de metàstasis regionals però no distants. El tumor pot ser de qualsevol mida, amb o sense ulceració. Es poden subdividir, de menys a més maligne, en els subestadis IIIA, IIIB, IIIC i IIID.
- Estadi IV. Es caracteritza per la presència de metàstasis distants, ja sigui en la pell, pulmons, sistema nerviós central, etc. Els tumors poden ser de qualsevol mida, amb o sense ulceració.

7.3. Tractament del melanoma cutani

El tractament del melanoma cutani varia en funció de l'estadi en el que es troba el tumor, tal i com es resumeix en la taula 4:

Taula 4. Tractaments estàndard per a cada estadi de melanoma.

Estadi segons el criteri TNM	Tractament estàndard
Melanoma d'estadi 0	Resecció quirúrgica
Melanoma d'estadi I	Resecció quirúrgica, amb o sense tractament ganglionar
Melanoma d'estadi II	Resecció quirúrgica, amb o sense tractament ganglionar
Melanoma d'estadi III resecable	Resecció quirúrgica, amb o sense tractament ganglionar
Melanoma d'estadi III no resecable, melanoma d'estadi IV i melanoma recurrent	Teràpia intralesional Immunoteràpia Inhibidors de transducció de senyal Quimioteràpia Teràpia local paliativa

L'excisió quirúrgica continua sent el mètode d'elecció principal per a tractar el melanoma localitzat. Quan aquest no s'ha disseminat més enllà del lloc on es va originar, els melanomes tenen un elevat percentatge de curació. Quan el tumor primari és d'entre 1 i 4 mm, es realitza una biòpsia del gangli limfàtic sentinella prèvia a l'excisió del tumor primari. Això permet detectar la presència de metàstasis ocultes en els ganglis regionals dels pacients. Múltiples estudis han demostrat la precisió diagnòstica de la biòpsia del

gangli sentinella, amb taxes de falsos negatius del 0% al 2%¹⁹⁹⁻²⁰⁴. Si es detecta melanoma metastàtic, es pot realitzar una limfadenectomia regional completa en un segon procediment.

En els últims anys, s'està expandint l'ús d'adjuvants en pacients amb alt risc de recurrència després de la resecció completa del melanoma cutani. La finalitat d'aquest tractament és la d'evitar o retardar una recidiva, ja sigui locorregional o a distància.

Un cop el melanoma s'ha disseminat a llocs distants, la taxa de curació és ben baixa i el nombre d'opcions per al tractament augmenta. Es tracta d'una malaltia altament resistent als tractaments antineoplàsics convencionals, com la quimioteràpia o la radioteràpia. En els melanomes d'estadi III no resecables, d'estadi IV o recidivants, les opcions de tractament són:

- Teràpia vírica oncolítica injectada al tumor. T-VEC és un virus d'herpes simple de tipus 1 (VHS-1) modificat genèticament per al seu ús en teràpia oncolítica. T-VEC infecta i descompon les cèl·lules canceroses però no les cèl·lules sanes. Això pot facilitar la destrucció de cèl·lules tumorals quan s'administra quimioteràpia o radioteràpia als pacients²⁰⁵.
- Immunoteràpia amb inhibidors de PD-1 i PD-L1 (pembrolizumab o nivolumab), anticossos monoclonals contra CTLA-4 (ipilimumab) o dosis elevades d'interleucina-2 (IL-2). Malgrat que ho fan per diferents vies, aquests tractaments estimulen el sistema immunitari del pacient per a ajudar-lo a combatre el càncer.
- Inhibidors de la transducció de senyal com dabrafenib, trametinib, vemurafenib, cobimetinib, encorafenib o binimetinib. D'aquesta manera es pot afectar diverses funcions cel·lulars, com la divisió i la mort cel·lular, ajudant en la destrucció de les cèl·lules tumorals.
- Quimioteràpia.
- Teràpia pal·liativa local per alleugerir els símptomes i millorar la qualitat de vida del pacient. Aquesta inclou cirurgia per extirpar possibles metàstasis, així com radioteràpia dirigida a l'encèfal, medul·la espinal o os.

El percentatge de malalts que desenvoluparan metàstasi depèn, en gran mesura, de l'espessor (gruix o profunditat) tumoral que, de forma més o menys variable, depèn del temps d'evolució de la lesió. Per aquesta raó, una detecció primerenca i un tractament precoç són fonamentals ja que en fases inicials s'aconsegueixen taxes de curació del 90%.

7.4. Model murí d'elecció de melanoma: Línia de melanoma B16-F10 en la soca de ratolí singènica C57BL/6

La majoria de cèl·lules de melanoma expressen diversos MDAs, la qual cosa les converteix en objectiu atractiu per a les vacunes contra aquest tipus de càncers. No obstant, des d'una perspectiva immunològica, els MDAs són proteïnes pròpies, a les quals pot existir una tolerància central i/o perifèrica, que pot dificultar la inducció de respostes immunitàries terapèutiques potents. Tot i així, en un estudi prospectiu de pacients amb melanoma metastàtic tractats amb IL-2, es va observar vitiligo en més d'un 20% dels pacients que responien al tractament. En canvi, cap dels pacients que no van respondre al tractament va desenvolupar vitiligo²⁰⁶. Per tant, sembla que es podria induir un cert grau d'autoreactivitat que, fins i tot, podria contribuir a la supervivència perllongada dels pacients. Aquestes observacions van motivar a investigar, en models murins, l'efecte antitumoral de la inducció de respostes autoimmunes.

Existeixen diversos models de melanoma en soques de ratolí comuns, incloent BALB/c i C57BL/6. A nivell experimental, és comú l'ús de cèl·lules de melanoma B16, derivades d'un melanoma espontani en un ratolí C57BL/6. Es tracta d'un model de tumor ben establert i àmpliament utilitzat en el qual el tractament és notòriament difícil. Alguns estudis, de fet, indiquen que en aquest model es pot induir una resposta immunitària contra els MDAs, resultant en la protecció i/o tractament del melanoma B16. Les cèl·lules B16-F10 s'utilitzen per a estudis *in vivo* ja sigui per estudiar el creixement local del tumor i el desenvolupament metastàtic espontani mitjançant la seva injecció intradèrmica, o bé per observar la producció de metàstasis artificials (principalment al pulmó) després de la seva injecció endovenosa. En el model de metàstasi pulmonar com que totes les cèl·lules tumorals que s'injecten al ratolí formen tumors en el pulmó, en realitat cada nòdul pulmonar resultant és tècnicament un tumor "primari" independent i no una metàstasi real, malgrat el terme metàstasi pulmonar s'utilitza àmpliament.

8. Estudis previs del nostre laboratori

8.1. Implicació del Sistema Nerviós en el desenvolupament de la Diabetis Tipus 1

Molts dels autoantígens descrits en la T1D no només s'expressen en les cèl·lules β pancreàtiques, sinó que també ho fan en cèl·lules del sistema nerviós. De fet, s'ha descrit que les neurones sensorials aferents són un component crític en la iniciació de la prediabetis¹³². Les que innerven el pàncrees tenen els seus cossos cel·lulars als ganglis dorsals raquidis o DRGs. Alteracions en aquestes cèl·lules s'han relacionat amb el desenvolupament de la T1D^{111,132,133,138,142,207}. En el nostre laboratori s'han realitzat diversos estudis histopatològics de les neurones sensorials dels DRGs durant el procés de desenvolupament de la diabetis tipus 1 en ratolins NOD i variants transgèniques i *knockout* d'aquesta soca per tal de determinar el paper d'aquestes cèl·lules en el desenvolupament de la malaltia. Tal i com es mostra en la figura 12, aquests estudis han demostrat que, en els ratolins NOD, algunes neurones sensorials aferents presenten grans vacuoles al seu citoplasma²⁰⁸. Aquestes vacuoles es poden observar també en ratolins NOD.Rag2^{-/-}, però no en ratolins C57BL/6, la qual cosa suggereix que no estan causades per un atac autoimmunitari, sinó que són quelcom intrínsec del *background* genètic de la soca NOD. Aquestes alteracions es poden observar a edats molt primerenques i es mantenen al llarg del temps. A més a més, les vacuoles observades presenten una membrana d'una sola capa, la qual cosa és característica de processos de excitotoxicitat²⁰⁹, un fenomen típic dels processos neurodegeneratius. A més a més, en els DRG d'un dels ratolins NOD es va observar una infiltració leucocitària similar a la que s'observa en els illots pancreàtics.

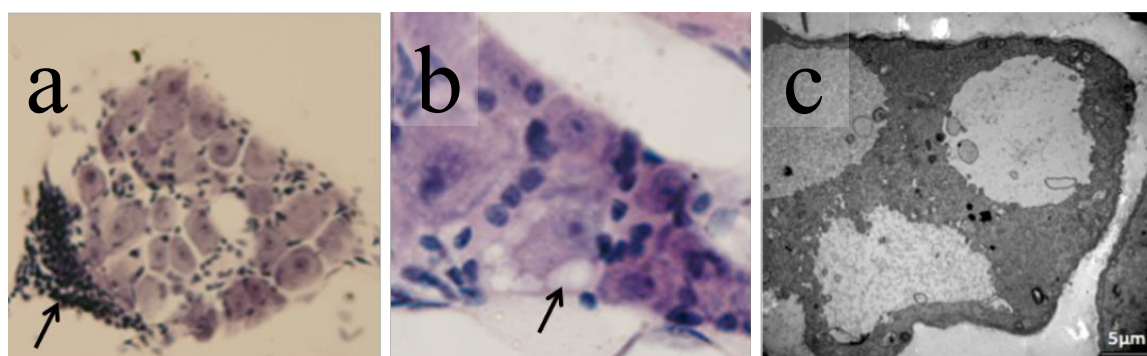


Figura 12. Afectacions histològiques observades en alguns DRG de ratolins NOD. (a) Infiltració leucocitària. (b) Vacuoles. (c) Microscòpia electrònica de les vacuoles.

8.2. *Estudis sobre la Periferina com a autoantigen i com a molècula inductora de mort cel·lular i activadora de la resposta immunitària.*

En els últims anys, els treballs de recerca del nostre laboratori han demostrat la rellevància dels limfòcits B en el desenvolupament de la T1D¹²⁶. A més a més, els limfòcits B infiltren els illots pancreàtics de la mateixa manera que els limfòcits T²¹⁰. Tot i així, no es coneix quin és el seu paper concretament. Per tal de conèixer més a fons el paper dels limfòcits B infiltrants a illots, el nostre grup va generar una col·lecció d'hibridomes de limfòcits B procedents de diferents soques de ratolí amb diferents graus d'insulitis i diabetis^{211,212}. Quan es va fer la caracterització tissular dels anticossos produïts per aquests hibridomes, es va observar que la majoria dels anticossos reconeixien la periferina. La periferina o PRPH és un filament intermedi (FI) que forma part del grup III dels FIs. Es troba comunament a les cèl·lules del sistema nerviós perifèric, on forma part del citoesquelet de les cèl·lules²¹². Diversos estudis han confirmat el paper de la periferina com a autoantigen en el desenvolupament de la T1D, tant en la immunitat humoral com en la cel·lular^{213,214}. Estudis en pacients diabètics també han identificat la periferina com un dels antigens reconeguts pels autoanticossos presents al seu sèrum²¹⁵, la qual cosa posa de manifest la rellevància dels limfòcits B anti-periferina en l'inici i progressió de la diabetis tipus 1. Tot i així, estudis realitzats en ratolins *knockout* per al gen de la periferina, han demostrat que l'absència d'aquesta no elimina el desenvolupament de diabetis autoimmunitària. Això posa de manifest que la T1D no és una malaltia en contra d'un sol antigen, malgrat que la resposta de limfòcits B anti-periferina promou i activa el desenvolupament de la malaltia.

En el nostre laboratori, durant el transcurs de l'estudi del paper de la periferina com a autoantigen en la T1D, utilitzant una llibreria peptídica d'aquesta molècula, es va veure que un dels pèptids (a partir d'ara, anomenat DIF-P) era capaç d'estimular la producció de citocines proinflamàtores en esplenòcits de ratolins NOD.Rag2^{-/-}. A més a més, el mateix fragment de la periferina era capaç d'induir la mort dels esplenòcits. Això obre una nova perspectiva en la funcionalitat de la periferina, suggerint un paper d'aquest fragment com a estimulador de la immunitat així com a inductor de mort cel·lular. És per això que al nostre laboratori s'ha estudiat el paper de la periferina més enllà de la seva activitat com a autoantigen, ja que sembla que juga un paper fonamental en l'activació dels limfòcits B gràcies a la seva funció com a DAMP. Estudis previs han demostrat que el fragment DIF-P de la periferina pot induir inflamació gràcies a la seva capacitat d'activar la producció de citocines proinflamàtores per part dels monòcits²¹⁶. A més a més, DIF-P és capaç d'induir

la mort en diversos tipus cel·lulars, tant murins com humans. Aquestes propietats es veuen amplificades o reduïdes quan es modifica el pèptid amb una cua de 3 lisines (DIF-P3K) o de 8 arginines (DIF-P8R). Així doncs, malgrat la producció de citocines proinflamatòries és menor (figura 13), els pèptids DIF-P3K i DIF-P8R indueixen major mort cel·lular (figura 14), probablement degut a que aquestes cues d'aminoàcids els converteixen en CPPs (de l'anglès, *Cell-Penetrating Peptides*) i permeten la seva millor internalització. Els CPPs són pèptids petits que contenen diversos aminoàcids carregats positivament, com la lisina o l'arginina, o que tenen seqüències que contenen un patró d'aminoàcids alterns polars i no polars, hidrofòbics²¹⁷. La via de mort cel·lular programada que activen les diverses variants de DIF-P canvia en funció del pèptid, activant-se la caspasa-1 i la caspasa-3 quan la internalització del pèptid és menor (com en el cas de DIF-P), però només la caspasa-3 quan les concentracions citoplasmàtiques són més elevades²¹⁶.

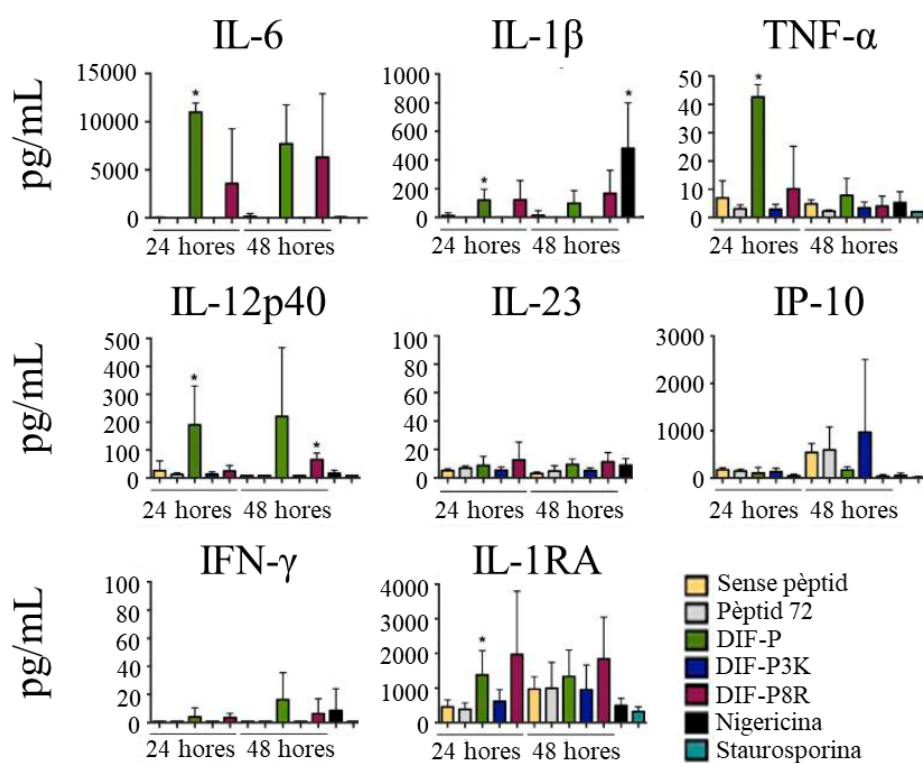


Figura 13. Producció de citocines de PBMCs (de l'anglès, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) humans cultivades amb els diferents pèptids. Es van incubar 4×10^5 leucòcits de sang perifèrica amb els diferents pèptids o amb els controls positius (Staurosporina i Nigericina) durant 24 o 48 hores. Transcorregut aquest temps es van recollir els sobrenedants i es va analitzar la producció de citocines. En el cas dels controls positius només es va analitzar la producció de citocines després de 24 hores. (*= $p < 0.05$). Ref: ²¹⁶.

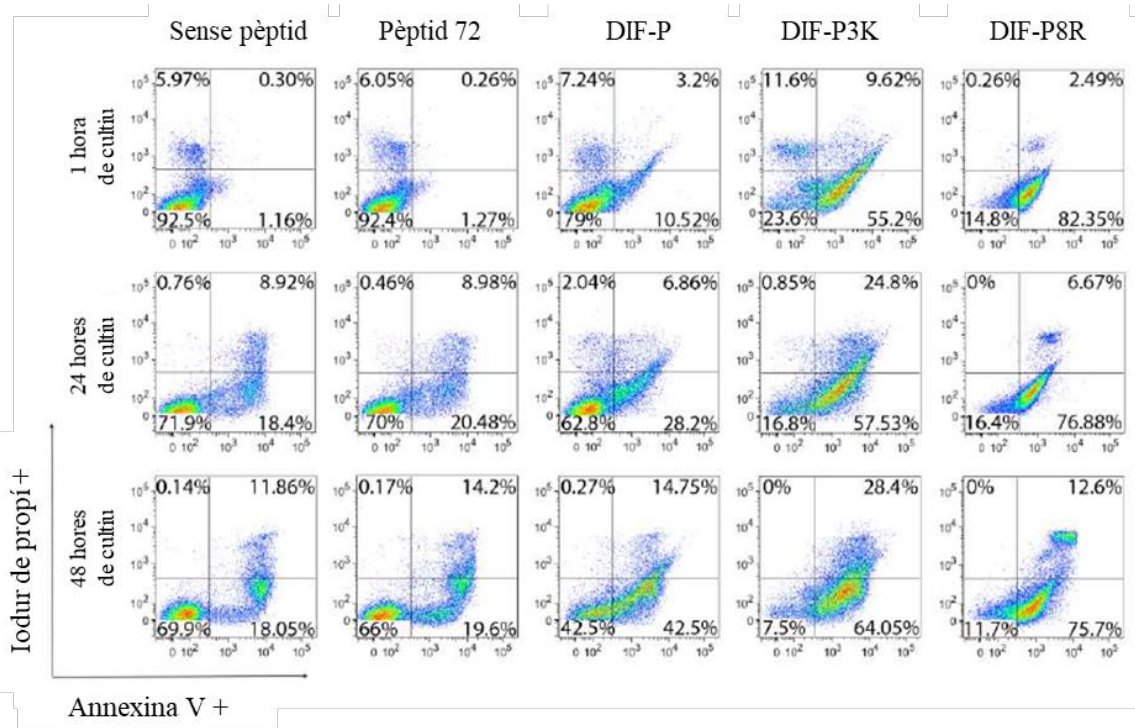


Figura 14. Inducció d'apoptosi i mort cel·lular de les PBMCs humanes quan es cultiven amb els diferents pèptids. Les cèl·lules es van incubar durant 1, 24 i 48 hores amb els diferents pèptids i, posteriorment, es van analitzar les cèl·lules positives per a Annexina V i iodur de propí (n=4). Ref: ²¹⁶.

Com que les seqüències proteiques dels FI són molt similars entre elles, al nostre laboratori es va examinar si la seqüència DIF-P es trobava, completa o parcialment, en filaments diferents a la periferina. Això va portar a determinar una seqüència consens (figura 15) present en gairebé tots els filaments intermedis que presentava molts pocs canvis d'aminoàcids. A més a més, aquests canvis mantenen sempre un patró del tipus d'aminoàcid substituït.

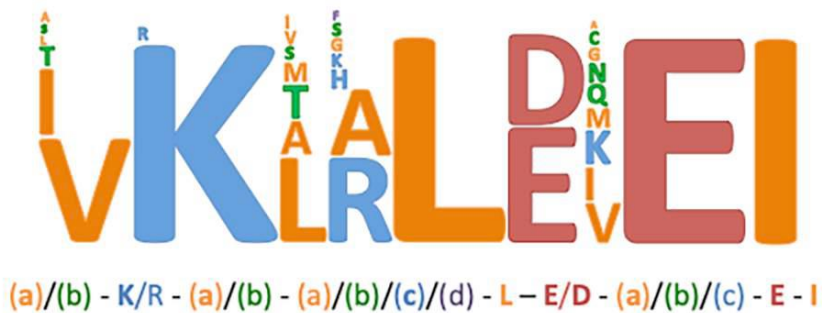


Figura 15. Seqüència consens incloent tots els canvis possibles trobats en els filaments intermedis. (a) aminoàcids (AAs) alifàtics no polars, (b) AAs polars no carregats, (c) AAs carregats positivament, (d) AAs aromàtics, (e) AAs carregats negativament. Ref: ²¹⁶.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

1. Hipòtesi

La resposta immunitària que es dona en el desenvolupament de la diabetis tipus 1 no va dirigida exclusivament contra les cèl·lules β dels illots pancreàtics, sinó que també existeix un atac immunitari contra cèl·lules del sistema nerviós. Concretament, estudis previs del nostre laboratori van demostrar que les neurones aferents sensorials de ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-} presenten alteracions histològiques que no estan presents en ratolins C57BL/6²⁰⁸. En vista d'aquests resultats, postulem que els ratolins NOD (i NOD.Rag2^{-/-}) tenen un patró d'expressió diferent al dels ratolins C57BL/6, cosa que ens pot ajudar a conèixer quins processos es veuen afectats en T1D i hipotetitzem que la T1D podria originar-se a través d'un procés neurodegeneratiu que induiria un alliberament anormal d'autoantígens neuronals. Aquests podrien ser els desencadenants de la resposta autoimmunitària contra el sistema nerviós perifèric (SNP), però també contra les cèl·lules β pancreàtiques, la qual cosa donaria lloc a l'aparició de la T1D.

D'altra banda, més enllà del paper de la periferina com a autoantigen rellevant en el desenvolupament de la T1D, estudis previs del nostre laboratori van identificar que el fragment DIF-P provinent d'aquesta molècula és capaç d'induir la producció de citocines proinflamàtòries així com d'induir la mort d'esplenòcits murins i humans. Donats aquests resultats, hipotetitzem que DIF-P i els seus derivats podrien esdevenir bons candidats per al tractament de tumors resistents als fàrmacs actuals gràcies a la seva capacitat no només d'actuar com a agent quimioteràpic induint la mort de les cèl·lules del tumor, sinó promovent l'activació del sistema immunitari del propi pacient envers a aquestes cèl·lules tumorals.

2. Objectiu principal

Un dels principals objectius d'aquest projecte és determinar la causa i/o les molècules implicades en el suposat procés neurodegeneratiu que condueix a l'aparició de T1D mitjançant estudis d'expressió d'ARNm. A més a més, determinar quins gens tenen una expressió diferencial en la malaltia, podria ajudar a determinar una manera de predir quins pacients presenten risc de desenvolupar T1D.

L'altre objectiu principal del present treball és estudiar en profunditat el mecanisme d'acció a través del qual la seqüència de DIF-P induïx la mort cel·lular així com l'alliberament de citocines proinflamàtòries i demostrar que es tracta d'un bon candidat per al tractament de tumors resistents als fàrmacs actuals.

3. Objectius específics

- 1.1. Comparar els perfils d'expressió genètica de les cèl·lules dels ganglis dorsals raquidis de ratolins NOD, NOD.Rag2^{-/-} i C57BL/6 mitjançant la tecnologia dels microarrays.
 - 1.2. Corroborar els resultats obtinguts en el microarrays mitjançant l'anàlisi per RT-qPCR de l'expressió d'alguns gens seleccionats.
 - 1.3. Analitzar si aquestes diferències en els perfils d'expressió es poden observar en leucòcits de sang perifèrica, tant de ratolins com de pacients diabètics, mitjançant l'anàlisi per RT-qPCR i/o ELISA.
-
- 2.1. Estudiar la capacitat citotòxica *in vitro* de la seqüència de DIF-P així com d'altres seqüències similars mitjançant estudis de mort cel·lular i apoptosi utilitzant tincions d'Annexina i Iodur de Propí.
 - 2.2. Determinar el mecanisme d'acció a través del qual els pèptids derivats de la periferina són capaços d'induir la mort de diferents tipus cel·lulars.
 - 2.3. Realitzar estudis *in vivo* en els models de melanoma (B16-F10) i mastocitoma (P815) que demostrin que DIF-P i les seves variants poden ser bons candidats per al tractament i/o prevenció del càncer.
 - 2.3.1. Realitzar estudis de Mort Cel·lular Immunogènica per tal de demostrar que els pèptids DIF són capaços de protegir enfront el creixement de les cèl·lules tumorals.
 - 2.3.2. Realitzar estudis per a tractar tumors preestablerts mitjançant la injecció intratumoral o sistèmica dels pèptids DIF.

MATERIALS I MÈTODES

1. Ratolins

1.1. Estabulació i manteniment

Els ratolins utilitzats en aquest estudi es van estabular en la zona SPF (de l'anglès, *Specific Pathogen Free*) de l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida amb la temperatura i humitat controlades. L'aigua i el menjar es van subministrar *ad libitum*.

Tant el disseny experimental com el manteniment dels ratolins es van realitzar seguint les directrius publicades en el decret de regulació de l'ús d'animals d'experimentació de la Generalitat de Catalunya, en el marc de les directives europees.

1.2. Colònies de ratolins

Durant la realització dels diversos estudis contemplats en aquesta tesi doctoral es van utilitzar diferents soques de ratolins.

La parella fundadora de la colònia **NOD** es va adquirir a *The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA)*.

El ratolí **NOD.Rag2^{-/-}** va ser proporcionat pel Dr. Pere Santamaria (Universitat de Calgary, Canadà). Aquests ratolins són doble *knock out* en el gen *Recombination Activating Genes-2 (Rag2)*, la qual cosa impedeix que les regions V(D)J es reordenin i, per tant, impossibilita la maduració dels limfòcits B i T.

Els ratolins de les soques **C57BL/6, CD1, FVB/N, SJL i DBA/2N** van ser subministrats per l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida.

1.3. Línies cel·lulars murines

Per als estudis, tant *in vitro* com *in vivo*, de les propietats dels pèptids en la immunoteràpia contra el càncer, es van utilitzar dues línies cel·lulars tumorals provinents de ratolí: la línia P815 (mastocitoma de ratolins DBA/2N) i la línia B16-F10 (melanoma de ratolins C57BL/6). La línia P815 es va obtenir a l'ATCC. La línia B16-F10 va ser cedida per la Dra. Anna Macià, del Grup de Patologia Oncològica del IRB Lleida. També es van fer servir dues línies de fibroblasts per tal de determinar certes vies moleculars de l'apoptosi cel·lular a través de les quals actuen els diferents pèptids: la línia MEF (CF-1) *wild type* i la línia MEF doble *knockout* per a BAX i BAFF. Ambdues línies de fibroblast van ser cedides pel Dr. Jacint Boix, de la Unitat de Farmacologia del IRB Lleida.

2. Mostres provinents d'humans

2.1. Mostres de sang humana

Per als estudis de diabetis tipus 1, es van utilitzar mostres de sang humana que van estar proporcionades pel Banc de Sang i Teixits de l'IRBLleida. Les mostres van ser recollides per el Dr. Dídac Mauricio i el seu equip amb el consentiment informat dels pacients. Els estudis es van realitzar en una cohort de pacients que incloïa tant homes com dones d'entre 20 i 32 anys.

2.2. Línies cel·lulars tumorals d'origen humà

Per a l'anàlisi de l'efecte dels pèptids derivats de la periferina, es va utilitzar la línia cel·lular tumoral NALM-6 (leucèmia de limfòcit B) proporcionada per la Dra. Eulàlia Genescà (Institut de Recerca de la leucèmia Josep Carreras, Campus ICO-Germans Trias i Pujol, Badalona).

3. Estudis d'expressió gènica

3.1. Aïllament de DRG i obtenció de sang perifèrica

Per tal de realitzar els estudis d'expressió mitjançant les tècniques de microarray i RT-qPCR, es van utilitzar mostres de DRG de ratolins de 3 i 12 setmanes de les soques C57BL/6, NOD i NOD.Rag2^{-/-}. També es van realitzar estudis de RT-qPCR en mostres provinents de sang perifèrica de ratolins de 3 setmanes d'edat de les soques C57BL/6, CD1, FVB/N, SJL i NOD.

Per tal d'aïllar els DRG és necessari realitzar prèviament una fixació sistèmica dels animals, prèviament anestesiats, a través d'una perfusió per via circulatoria amb paraformaldehid. Un cop fixat l'animal, es poden extreure els DRG, els quals es conserven en paraformaldehid 4% a 4°C fins al moment de processar-los. Per conèixer el protocol amb més detall, veure la descripció d'aquest procediment a la tesi doctoral de Na Berta Arpa²⁰⁸.

D'altra banda, per tal d'obtenir els leucòcits de la sang perifèrica dels ratolins, es va realitzar un protocol d'exsanguinació. Primer de tot, els animals es van anestesiar amb Isofluorà (IsoFlo, 571329.8, Ecuphar veterinaria S.L.). Un cop adormits, es va realitzar una punció cardíaca amb una agulla de 25G, amb una inclinació d'uns 45°. La sang obtinguda es va traspasar a un tub d'heparina (16.443, Microvette® CB 300 Hep Li, SARSTEDT, S.A.U.) per tal d'evitar la seva coagulació. En el moment d'aïllar els leucòcits, es va transvasar la sang a un tub de 5 mL al que s'hi va afegir 4 mL de H₂O miliQ per cada

300 μ L de sang. Es va incubar durant 30 segons per tal de lliurar els eritròcits i es va parar la reacció afegint PBS 1X (*Phosphate-Buffered Saline*: 0,8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 , 1 L H_2O i pH 7.2) fins als 50 mL. Es va centrifugar 5 minuts a 600xg i es va descartar el sobrenedant. El pellet de leucòcits es va resuspendre en 1 mL de PBS 1X per fer-ne un rentat addicional, i es va centrifugar de nou 5 minuts a 900xg. Finalment, es va eliminar el sobrenedant i es va guardar el pellet a -80°C fins al seu ús.

3.1.1. Extracció de ARN i transcripció a ADNc

Per tal d'aïllar el ARN dels diferents tipus cel·lulars objecte d'estudi, es va utilitzar el FFPE RNA Purification Kit (25300, Norgen Biotk Corp) i es va seguir el protocol del fabricant. Un cop obtingut el ARN, es va procedir a la seva transcripció cap a ADNc mitjançant el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4374966, Applied Biosystems).

3.2. Realització i anàlisi de microarrays

Per a la realització dels microarrays, es van mesurar les concentracions totals d'ARN de mostres de ratolí amb un espectrofotòmetre Nanodrop 1000 (ThermoFisher) i es va avaluar la seva integritat mitjançant l'Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, EUA). Totes les mostres van mostrar un grau d'integritat d'ARN similar. La placa de matrius Genechip © Mouse Clariom S 24x (ThermoFisher) es va utilitzar per analitzar patrons d'expressió gènica a escala de genoma complet en una única matriu. El material inicial va ser de 2 ng d'ARN total per cada mostra. Breument, es va generar ADN de cadena simple (ssDNA) sensible a partir de l'ARN total amb el GeneChip WT Pico Reagent Kit (Thermofisher) segons les instruccions del fabricant. El ssDNA es va fragmentar, etiquetar i hibridar amb les matrius amb el GeneChip WT Terminal Labeling and Hybridization Kit (Affymetrix). La placa de matrius es va escanejar i processar amb Affymetrix GeneChip Command Console per obtenir fitxers .CEL d'intensitat de matriu d'expressió. Tota aquesta tecnologia de microarrays es va portar a terme al servei científicotècnic de microarrays de l'Institut de Recerca de Vall d'Hebron (VHIR). L'anàlisi del transcriptoma de les cèl·lules dels DRG es va realitzar en col·laboració amb el Dr. Alex Sánchez del Departament d'Estadística i Bioinformàtica del VHIR i de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

La selecció dels gens diferencialment expressats es va fer utilitzant un enfocament de model lineal (similar a un ANOVA estàndard) per a cada gen seguit de la regularització de la variància basada en el modelatge empíric de Bayes. A més a més, degut a que es realitzaven

diversos tests comparatius per a cada gen, es va ajustar els *p-value* per tal d'obtenir un fort FDR (*False Discovery Rate*) mitjançant el mètode Benjamini i Hochberg. Per tal de trobar gens afectats per dues o més condicions, es va realitzar una anàlisi de comparacions múltiples (*multiple comparison analysis*), que permet conèixer el nombre de gens expressats diferencialment comuns a cada parell o tres comparacions.

Un cop determinats quins gens es trobaven diferencialment expressats en les diverses soques ($p\text{-value} < 0.05$ i $|\text{LogFC}| > 1$), es van utilitzar diferents eines bioinformàtiques per tal d'explorar la seva funció, ubicació cel·lular i expressió de teixits. Es van fer servir les eines *Gene Database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), *Mouse Genome Informatics* o MGI (<http://www.informatics.jax.org/>) i *Gene Ontology* o GO (<http://geneontology.org/>) per tal de determinar la funció molecular i el procés biològic en el qual estaven involucrats els diferents gens i proteïnes d'interès. També es va utilitzar la base de dades T1Dbase (<http://www.t1dbase.org/>) per tal de determinar quins dels gens d'interès es trobaven associats a un locus de susceptibilitat a T1D. L'eina BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>) es va fer servir per tal d'analitzar el percentatge de similitud entre els gens candidats murins amb els seus ortòlegs humans. Finalment, les eines *WebGESTALT* (*WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit*, <http://www.webgestalt.org>) i *PantherDB* (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships DataBase*, <http://www.pantherdb.org>) es van utilitzar per a intentar determinar si hi havia alguna categoria enriquida en la nostra llista de gens diferencialment expressats, ja fos a nivell de funció molecular, procés biològic o component cel·lular.

3.3. Assaig RT-qPCR

Per a l'assaig de PCR quantitativa a temps real (*Real Time quantitative PCR*, RT-qPCR) es va utilitzar la Taqman Universal Master Mix II, no UNG (4440040, Applied Biosystems) i diferents Taqman Gene Expression Assays (4448892, Applied Biosystems) per detectar diversos gens: *Ahcy* (Mm01621912_s1 i Hs04183463_g1), *Arl8a* (Mm01293357_gH i Hs00373395_m1), *Rps12* (Mm03030276_g1 i Hs00831630_g1), *Scg5* (Mm00486077_m1 i Hs00161638_m1) i *Vcp* (Mm01702786_gH i Hs00997642_m1), així com *GAPDH* (351370, Mm99999915_g1, Applied Biosystems) i *Hprt1* (4448485, Hs02800695_m1, Applied Biosystems) com a controls constitutius (gen *housekeeping*).

3.4. Assaig *ELISA*

Per a l'estudi de proteïna *Scg5* en sèrum es va usar el *ELISA Kit for Secretogranin V (SCG5)* (SEC834Hu, Cloud-Clone Corp.) i es va seguir el protocol del fabricant.

Abans de començar l'*ELISA*, es va preparar la corba patró. Per fer-ho es va centrifugar el vial de l'estàndard 30 segons a 12000xg i es va reconstituir amb 1 mL de *Sample Diluent* (subministrat pel kit). Un cop reconstituït, es va deixar 10 minuts en agitació i, posteriorment es van fer dilucions seriades per a obtenir la corba patró. D'altra banda, es van diluir les mostres (100 µL sèrum i 100 µL de PBS 1X) per tal d'obtenir una bona quantificació de la *Scg5*. Un cop preparades tant les mostres com la corba patró, es van plaquejar 100 µL de mostra, corba o blanc en la placa *ELISA* subministrada en el kit, es va cobrir amb un film adhesiu i es va incubar durant 1 hora a 37°C. Seguidament, es va eliminar el volum i es va afegir 100 µL de *Detection Reagent A 1X* (del kit) a cada pou. Es va cobrir la placa amb un film adhesiu nou i es va incubar 1 hora a 37°C. A continuació es va aspirar el volum de tots els pous i es van fer 5 rentats de 2 minuts amb 350 µL de *Wash Solution 1X* (del kit). Immediatament després es van afegir 100 µL de *Detection Reagent 1X* (del kit) a tots els pous, es va cobrir la placa amb film adhesiu i es va incubar 30 minuts a 37°C. Es van fer 5 rentats de 2 minuts amb 350 µL de *Wash Solution 1X* i es van afegir 90 µL de *Substrate Solution* (del kit) a cada pou. Es va fer una incubació de 10-20 minuts a 37°C, en la que es va anar comprovant un canvi de color del volum de transparent a diferents gradacions de blau. Es van afegir 50 µL de *Stop Solution* (del kit) que va fer que el blau passés a diverses tonalitats de groc. Per últim, es va realitzar una lectura de la densitat òptica a 450 nm en el lector de microplaques *Epoch* (BioTek Instruments).

4. Citometria de flux

4.1. *Obtenció de suspensions cel·lulars*

4.1.1. *Obtenció d'esplenòcits*

Per tal de realitzar l'anàlisi citomètric de mostres procedents de melsa va ser necessari disgregar la melsa per obtenir una suspensió cel·lular. Abans però, es va haver de realitzar un procés d'hemòlisi necessari per eliminar els eritròcits.

La melsa va ser extreta de l'animal i dipositada en una placa de Petri amb 10 mL de tampó d'hemòlisi (taula 5). Amb la part esmerilada de dos portaobjectes es va disgregar la melsa fins a tenir una suspensió cel·lular, que es va deixar incubant amb el tampó d'hemòlisi durant 8 minuts per tal de lisar els eritròcits. Transcorregut aquest temps, es van afegir 40

mL de HBSS 1X (H3BE10-527F, Cultek) i es va transferir tot el volum a un tub de 50 mL a través d'un filtre de 40 µm per tal d'eliminar qualsevol residu de teixit. La suspensió cel·lular es va centrifugar 10 minuts a 210xg i es va decantar el sobrenedant, de color vermellós fruit de la lisi dels eritròcits. Finalment, el pellet cel·lular resultant es va resuspendre en Medi de Cultiu Complert o MCC (taula 6) i es van comptar en una cambra de Neubauer.

Taula 5. Composició del Tampó d'hemòlisi.

Reactiu	Referència, Casa Comercial
1,0297 g TRIS	1.083.820.500, Merck
3,735 g NH ₄ Cl	141121.1210, Panreac
500 mL H ₂ O mQ, pH 7,4	

Taula 6. Composició del Medi de Cultiu Complert.

Reactiu	Referència, Casa Comercial	Volum
Medi RPMI-1640 sense L-glutamina	H3BE12-167F, Cultek	450 mL
Sèrum Fetal Boví (FBS)	91S1860-500, Cultek	50 mL
L-glutamina 200 mM	25-005-CI, Corning	5 mL
Penicilina/Estreptomicina	H3DE17-602E, Cultek	5 mL
MEM Sodium Pyruvate 100 mM	H3BE13-115E, Cultek	5 mL
β2-mercaptoetanol 50 mM	M6250, Sigma Aldrich Chimie	0,5 mL

4.1.2. *Obtenció de monòcits provinents de medul·la òssia*

Primerament, es van sacrificar els ratolins per dislocació cervical. Es va treure la pell de la part inferior abdominal i de les extremitats inferiors i, amb cura de no trencar-los, es van extreure el fèmur i la tibia bilaterals. Es va eliminar tot el teixit muscular adjacent i es van submergir el fèmur i la tibia en etanol 70% per tal d'esterilitzar-los. El romanent d'alcohol es va eliminar submergint els ossos en PBS 1X + FBS 2% estèril. Seguidament, es van ressecar les epífisis d'aquests ossos per tal de poder accedir a la medul·la òssia. En una placa de Petri, es va injectar PBS 1X + FBS 2% a través del forat central de la diàfisi òssia del fèmur i la tibia amb l'ajuda d'una agulla de 23G per tal d'extreure tota la medul·la. Amb l'ajuda de dos portaobjectes esmerilats, es van disgregar els cúmuls de cèl·lules obtinguts. Es va recollir tot el volum en un tub de 50 mL, filtrant-lo primer amb un filtre de 40 µm per tal d'eliminar qualsevol residu de teixit o os. Es van centrifugar les cèl·lules

a 600xg durant 5 minuts i es van resuspendre en 10 mL de PBS 1X + FBS 2% per tal de comptar-les en una cambra de Neubauer.

Per tal de purificar els monòcits de la medul·la òssia obtinguda, es va utilitzar el kit EasySep Mouse Monocytes Isolation Kit (19861, Stemcell). Tal i com indica el protocol del fabricant, es va preparar una mostra en un tub de 50 mL a una concentració de 10^8 cèl·lules/mL i se'ls va afegir 50 μ L de sèrum de rata. Es va transferir el volum a un tub de 5mL de fons rodó estèril. Es van afegir 100 μ L de la barreja d'anticossos preparada prèviament amb 50 μ L de component A i 50 μ L de component B, i posteriorment es va portar a terme una incubació de 5 minuts a 4°C. Passat aquest temps es van afegir 75 μ L de *RapidSpheres*TM per cada 1 mL de mostra. Aquestes havien estat prèviament barrejades mitjançant un vòrtex durant 30 segons. Finalment, es va afegir PBS 1X + FBS 2% fins a obtenir un volum final de 2,5 mL i es va inserir el tub a l'imant EasySepTM magnet (18000, Stemcell) durant 3 minuts a temperatura ambient. El kit fa una selecció negativa, de manera que les cèl·lules que ens interessin queden en el sobrenedant, el qual recollim en un altre tub de 5 mL. Aquest últim pas el vam repetir per tal d'obtenir la màxima purificació de les cèl·lules. Un cop purificades, es van resuspendre en MCC i es van comptar en una cambra de Neubauer.

4.2. Assaig Annexina V – Iodur de propí

Per als assaigs de mort cel·lular, es va utilitzar el CFBlue Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (ANXVKCFB-100T, Immunostep). Es va seguir el protocol del fabricant:

1. Primer, es van fer 2 rentats a les cèl·lules amb PBS 1X, centrifugant-les 5 minuts a 300xg i es van resuspendre amb Annexin Binding Buffer 1X (subministrat pel kit) a una concentració de 1×10^6 cèl·lules/mL.
2. Es van afegir 0,25 μ L de Annexin V-CFTM Blue i 0,25 μ L de iodur de propidi (IP) per cada 50 μ L de suspensió cel·lular i es van incubar durant 15 minuts a 4°C protegits de la llum.
3. Finalment, es van afegir 200 μ L de Annexin Binding Buffer 1X i es van analitzar al citòmetre.

4.3. Anàlisi de caspases mitjançant FLICA

Per tal d'analitzar l'activació de caspases en presència dels pèptids, es van realitzar tincions amb diferents FLICAs. Els FLICA són pèptids marcats amb fluorocroms que són capaços de penetrar la membrana cel·lular i unir-se a la part activa de les caspases. Quan no hi ha

activitat caspasa, els FLICA no s'uneixen a res i, per tant, les cèl·lules són negatives per al fluorocrom en qüestió. En aquest estudi es van fer servir dos assaig FLICA diferents: FAM-FLICA Caspase 3/7 Assay Kit (94, Immunochemistry Technologies) i FLICA-660 Caspase 1 Assay Kit (9122, Immunochemistry Technologies).

Un cop les cèl·lules van estar sotmeses als estímuls de mort cel·lular programada amb els diferents pèptids, es van centrifugar 5 minuts a 200xg i es van resuspendre en 150 µL MCC, els quals contenien 5 µL de la dilució 1:10 del stock original del FLICA (diluït en MCC). Es van incubar les cèl·lules durant 1 hora a 37°C, protegides de la llum. Un cop transcorregut aquest temps, es va afegir 1 mL de tampó d'unio d'annexina (inclòs en els kits) i es van centrifugar les cèl·lules 5 minuts a 200xg.

Es va fer un segon rentat amb 500 µL de tampó d'apoptosi i, finalment, es van resuspendre les cèl·lules en PBS 1X per tal d'observar-les al citòmetre.

4.4. Estudis de producció d'IL-2 i IFN γ

4.4.1. Co-cultiu d'esplenòcits amb cèl·lules tumorals

Per tal de determinar la capacitat de les vacunes d'induir una resposta immunitària efectora antitumoral, limfòcits T de melsa de ratolins, que prèviament havien estat immunitzats amb les vacunes preparades amb els diferents pèptids, es van co-cultivar amb cèl·lules tumorals B16-F10 durant 24 hores i, a continuació, es va analitzar la seva capacitat de secretar IL-2 i IFN γ .

Per fer-ho, primerament es van cultivar 50.000 cèl·lules B16-F10 en una placa p96 de fons pla (167008, Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, ThermoFisher Scientific) en 200 µL de MCC. Aquestes es van deixar 24 hores a 37°C i 5% de CO₂ per tal que s'adherissin correctament al fons de cada pou. A continuació es va treure tot el medi i es van afegir 250.000 esplenòcits de ratolí C57BL/6 en un volum final de 200 µL de MCC i es va deixar la placa a 37°C i 5% de CO₂ durant 24 hores més, de manera que aquells limfòcits T anti-B16-F10, al entrar en contacte amb aquestes, s'activessin i secretessin IL-2 i IFN γ .

4.4.2. Assaig de secreció de citocines

Un cop transcorregut el temps necessari per a que els limfòcits secretin IL-2 i IFN γ , es va realitzar una tinció de les cèl·lules utilitzant els kits de detecció de citocines IFN γ Secretion

Assay – Detection Kit (PE) (130-054-202, Miltenyi Biotec) i IL-2 Secretion Assay – Detection Kit (APC) (130-090-763, Miltenyi Biotec).

Els esplenòcits es van recollir en un tub eppendorf i es va fer un rentat amb 1 mL de buffer (PBS 1X, 0,5% FBS, 2 mM EDTA) fred. Es van centrifugar les cèl·lules durant 10 minuts a 300xg i es va descartar el sobrenedant. El pellet es va resuspendre en 40 µL de medi de cultiu fred i es van afegir 10 µL de cadascun dels reactius de captura o *Catch Reagent* de les dues citocines. Es va incubar la mescla 5 minuts en gel i, posteriorment, es va afegir 1 mL de medi de cultiu a 37°C. A continuació, es van incubar les cèl·lules a 37°C durant 45 minuts, invertint els tubs cada 5 minuts per a resuspendre aquelles cèl·lules que precipitessin. Seguidament, es va prosseguir amb el marcatge de les cèl·lules amb els anticossos de detecció. Es va afegir 0,5 mL de buffer fred a cada tub i es van centrifugar 10 minuts a 300xg i es va descartar el sobrenedant. El pellet es va resuspendre en 40 µL de buffer fred al qual se li va afegir 5 µL de cadascun dels anticossos de detecció (anti-IL-2-APC i anti-IFN γ -PE). A més a més, les cèl·lules es van tenyir amb els anticossos anti-CD4-PerCP (553052, BD) i anti-CD8-FITC (MCD0801, ThermoFisher Scientific) per tal d'identificar quines cèl·lules eren les productores d'aquestes citoquines. Les cèl·lules es van incubar durant 10 minuts en gel i, seguidament, es va afegir 1 mL de buffer i es van centrifugar durant 10 minuts a 300xg. El pellet es va resuspendre en 500 µL de buffer i es van analitzar les cèl·lules per citometria de flux.

4.5. Anàlisi dels resultats de citometria

L'anàlisi dels resultats de citometria de flux es va fer utilitzant el programa FlowJo 8.7 (FlowJo Software, BD).

5. Estudis *in vitro*

5.1. Estudis de citotoxicitat dels pèptids

Per tal d'analitzar l'efecte *in vitro* dels diferents pèptids utilitzats en l'estudi (taula 7), es van cultivar els diversos tipus cel·lulars a una concentració de 300.000 cèl·lules en un volum final de 200 µL. De manera genèrica, a aquestes se'ls va afegir els diferents pèptids a una concentració de 55µM. En alguns casos es van realitzar dilucions seriades d'aquests pèptids. Es van recollir els sobrenedants i es van analitzar les cèl·lules als temps d'una i 24 hores. Tots els pèptids utilitzats han estat sintetitzats per la unitat de síntesi de pèptids de la Universitat Pompeu Fabra de Barcelona.

Taula 7. Seqüències d'aminoàcids, pes molecular i puresa dels pèptids utilitzats en els diversos estudis *in vitro* i *in vivo*.

Nom del Pèptid	Seqüència d'aminoàcids	Pes molecular (Da)	Puresa (%)
DIF-P	LLNVKMALDIEIATYRKLLE	2346,88	94
DIF-P3K	LLNVKMALDIEIKKK	1756,24	91-97
DIF-P8R	LLNVKMALDIEIRRRRRRRR	2621,20	97-98
DIFc2A-3K	VAMALDIEIKKK	1358,7	95
DIFc5A-3K	VKMAADIEIKKK	1373,7	96
DIFc6A-3K	VKMALAEIKKK	1371,8	95
DIFc8A-3K	VKMALDIAIKKK	1375,8	94
DIFc9A-3K	VKMALDIEAKKK	1373,7	96
DIFc-CK	VKMALDIEK	1159,5	91
DIFc-AK	KVKMALDIEI	1159,6	97
DIFc-AYT	VKMALDIEIATY	1366,6	94
78.11	VKMALDIEKKK	1302,6	98
78.12scr	KIAVEKLDKMIK	1415,8	98
72	GGYQAGAARLEELRQLKEE	2247,47	98-99
72-8R	GGYQAGAARLEELRQLKEERRRRRRR	3496,95	98
KRT9c	IKMRLEKEI	1159,5	97
KRT9c-8R	IKMRLEKEIRRRRRRRR	2409,0	97
KRT13	LLDIKTRLEQEIATYRSLLE	2404,79	95
KRT18-8R	LLNIKVKLEAEIRRRRRRRR	2632,2	95
KRT18s-8R	IKVKLEAEIRRRRRRRR	2291,8	97
KRT32	LLDVRARLEGEINTYRSLLE	2360,7	91
KRT84	LMNAKLGLDIEIATYRRLLE	2332,79	97
LMNA	LLDIKLALDMEIHAYRKLLE	2397,91	92
(A647)78.K3 iRGD (dithiol form)	Quasar670-LLNVKMALDIEIKKKGGCRGDK GPDC (dithiol form)	3281,06	98
(A647)78.K3 iRGD (cyclic sulfide)	Quasar670-LLNVKMALDIEIKKKGGCRGDK GPDC (cyclic sulfide)	3279,04	99
72-Biotina	GGYQAGAARLEELRQLKEE – biotina	3098,52	
72-8R-Biotina	GGYQAGAARLEELRQLKEERRRRRRR – biotina	3765,3	98
DIF-P-Biotina	LLNVKMALDIEIATYRKLLE – biotina	2615,24	91
DIF-P8R-Biotina	LLNVKMALDIEIRRRRRRRR – biotina	2889,59	93

Continuació Taula 7. Seqüències d'aminoàcids, pes molecular i puresa dels pèptids utilitzats en els diversos estudis *in vitro* i *in vivo*.

Nom del Pèptid	Seqüència d'aminoàcids	Pes molecular (Da)	Puresa (%)
20	ATRSNEKQELQELNDRFANF	2410,61	92,82
21	EKQELQELNDRFANFIEKVR	2506,82	94,56
22	QELNDRFANFIEKVRFLEQQ	2524,84	89,49
23	RFANFIEKVRFLEQQNAALR	2450,85	82,84
24	IEKVRFLEQQNAALRGELSQ	2329,66	84,98
25	FLEQQNAALRGELSQARGQE	2245,46	87,88
26	NAALRGELSQARGQEPARAD	2110,29	94,55
27	GELSQARGQEPARADQLCQQ	2184,37	95,76
28	ARGQEPARADQLCQQELREL	2310,57	89,69
29	PARADQLCQQELRELRRELE	2453,78	93,18
30	QLCQQELRELRRELELLGRE	2510,9	97,3

6. Estudis histològics

6.1. Tincions per fluorescència

Per tal de poder identificar l'àrea i/o organel·la cel·lular on interaccionen els diferents pèptids derivats de la periferina, es van realitzar tincions de fluorescència en cèl·lules HEp-2 (508100, HEp-2 ANA Slide, Inova Diagnostics) i en *C. luciliae* (508200, dsDNA (*Crithidia luciliae*) Slide, Inova Diagnostics). Es tracta de portaobjectes comercials que ja tenen les cèl·lules permeabilitzades i fixades.

Per a la tinció de la diana a la qual s'uneixen els diversos pèptids, es va seguir el protocol següent. Primer de tot es van realitzar 5 rentats de 10 minuts amb PBS 1X + Tritó 0,1% (T8787, Sigma Aldrich). Seguidament, es van incubar les cèl·lules amb els diferents pèptids 72, 72-8R, DIF-P i DIF-P8R, tots ells marcats amb biotina, durant 1 hora a temperatura ambient. A continuació, es va descartar l'excés de pèptid amb 3 rentats de 10 minuts amb PBS 1X + Tritó 0,1% i, seguidament, es van incubar les HEp-2 amb estreptavidina marcada amb eFluor570 (41-4317-80, Thermofisher Scientific) juntament amb Hoechst (14533, Sigma-Aldrich) durant 30 minuts a 4°C. Aquesta incubació es va fer en una cambra humida. Per últim, es van realitzar 3 rentats més de 10 minuts amb PBS 1X + Tritó 0,1% abans de muntar el cobreobjectes amb Mowiol (475904, Mowiol 4.88, Calbiochem). Un cop finalitzada la tinció, es van observar els portaobjectes al microscopi confocal FV1000

d'Olympus i es van analitzar els resultats de les tincions amb els softwares FV10-AS3.1 d'Olympus i Image J.

Les cèl·lules HEP-2 han estat emprades de manera habitual a nivell clínic en l'estudi de la presència d'autoanticossos en el sèrum de pacients amb diverses malalties autoimmunitàries. La seva importància en el diagnòstic de certes malalties ha permès generar un conjunt de patrons de tinció establerts i que, en el nostre cas, podrien ajudar a entendre on es localitzen els pèptids per a fer la seva funció. És per això que les imatges de fluorescència obtingudes es van comparar amb els patrons de tinció nuclears i citoplasmàtics establerts en els estudis d'autoimmunitat²¹⁸.

6.2.Criomicroscòpia electrònica

Les imatges de criomicroscòpia electrònica es van obtenir en col·laboració amb la Unitat de Criomicroscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

Per a l'anàlisi de l'efecte dels pèptids en limfòcits es va extreure la melsa d'un ratolí NOD.Rag2^{-/-} i es va col·locar en una placa de petri amb 10 mL de RPMI. Amb l'ajuda de dos portaobjectes esmerilats, es va disgregar mecànicament. Poc a poc, per tal de no barrejar les fases, es va transvasar el volum a un tub de 15 mL on prèviament s'havien afegit 4 mL de Lymphocyte Separation Medium (H317-829F, Cultek). A continuació, es va centrifugar el volum durant 30 minuts a 450xg, sense acceleració ni fre a la centrífuga. Amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur es va recollir l'anell situat entre les dues fases, on es troben els limfòcits, i es van passar a un tub de 50 mL amb RPMI. Es van contar les cèl·lules en una cambra Neubauer i es van dissoldre $1,5 \times 10^7$ cèl·lules en 5 mL de MCC, el qual havia estat prèviament escalfat a 37°C. Seguidament es van afegir a una concentració de 110 µM els diferents pèptids marcats amb biotina (taula 7) i es van incubar les cèl·lules a 37°C durant 15 minuts. Per tal de preparar els limfòcits per a l'anàlisi per criomicroscòpia electrònica, es van centrifugar durant 5 minuts a 300xg, es va treure el sobrenedant i es van fixar les cèl·lules amb 1 mL de fixador (tampó fosfat 0,1M amb 0,1% glutaraldehyd i 4% PFA). Aquest fixador es va canviar dues vegades cada 30 minuts. Finalment, es va descartar el fixador i es va substituir per 1 mL de tampó fosfat amb 2% PFA fins al moment del processament de les mostres per part de la Unitat de Criomicroscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

7. Precipitació de proteïnes nuclears

7.1. *Extracció de les proteïnes nuclears*

Per a l'obtenció de les proteïnes nuclears de cèl·lules en suspensió, es va utilitzar el ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (539790, Millipore). Es va fer l'extracció seguint el protocol del fabricant per a obtenir la fracció nuclear de les cèl·lules NALM-6. Es va partir de 5 milions de cèl·lules, les quals es van rentar dues vegades amb 500 µL del *Wash Buffer* proporcionat pel kit. Seguidament, se'ls va afegir 1 mL de *Extraction Buffer I*, suplementat amb 5 µL de Inhibidors de Proteases, i es va incubar durant 10 minuts a 4°C i en agitació. Transcorregut aquest temps, es va fer una centrifugació a 4°C de 10 minuts a 500xg. Es va separar el sobrenedant, el qual contenia la fracció citoplasmàtica de les cèl·lules, en un tub net. El pellet cel·lular restant es va incubar durant 30 minuts a 4°C en agitació contínua amb 1 mL de *Extraction Buffer II*, suplementat amb 5 µL de Inhibidors de Proteases. Seguidament, es va fer una centrifugació a 4°C de 10 minuts a 5000xg. Es va separar el sobrenedant, el qual contenia la fracció de membrana i orgànuls de les cèl·lules, en un tub net. El pellet es va incubar durant 10 minuts a 4°C en agitació contínua amb 1 mL de *Extraction Buffer III*, suplementat amb 5 µL de Inhibidors de Proteases i 1,5 µL *Benzonase Nuclease*. Finalment, es va fer una centrifugació a 4°C de 10 minuts a 6800xg i es va separar el sobrenedant en un tub net, el qual contenia la fracció nuclear de les cèl·lules. En algun dels casos es va concentrar la quantitat de proteïna i es va realitzar un canvi de tampó. Mentre que els extractes no concentrats es trobaven en el tampó d'extracció, els concentrats estaven en PBS 1X.

Amb l'ajuda del Nanodrop es va mesurar la quantitat de proteïna obtinguda després de l'extracció i es van guardar les fraccions nuclears a -20°C fins al moment de la precipitació.

7.2. *Precipitació de la diana proteica de DIF-P*

Per a la precipitació de les proteïnes nuclears a les que s'uneixen els pèptids derivats de la periferina, es van incubar els extractes proteics amb els pèptids DIF-P i DIF-P8R units a Biotina (Taula 7) així com els controls 72 i 72-8R units a Biotina (Taula 7). A continuació, i amb l'ajuda d'unes *beads* magnètiques marcades amb estreptavidina (GE28-9857-38, Sigma-Aldrich), es van separar els pèptids amb les proteïnes unides a aquests.

Abans d'utilitzar les *beads*, es va eliminar el seu líquid preservatiu amb l'ajuda d'un rack magnètic. Per a cada extracte es van fer servir 100 µL de *beads*, els quals es van col·locar en un eppendorf i es van rentar dues vegades amb 500 µL de *Binding Buffer* (TBS1x, 50mM

Tris-HCl, 150mM NaCl). Seguidament, es van utilitzar la meitat d'aquestes *beads* per a fer una incubació de 1 hora a 4°C en agitació dels extractes nuclears, però sense els pèptids. D'aquesta manera es van eliminar les unions inespecífiques amb l'estreptavidina i/o a les *beads*. L'extracte proteic resultant es va incubar durant 1 hora a temperatura ambient amb 5 µL dels pèptids units a biotina. Transcorregut aquest temps, es va afegir l'extracte proteic al tub amb l'altra meitat de les *beads* d'estreptavidina i es va dur a terme una incubació durant 1 hora a 4°C i en agitació. Així, els pèptids biotinilats van unir-se a les *beads* d'estreptavidina i, amb ells, les proteïnes nuclears que havien interaccionat amb DIF-P o DIF-P8R. Transcorregut el temps d'incubació, es va eliminar el líquid (extracte proteic restant) amb l'ajuda d'un rack magnètic i es van fer 3 rentats amb 500 µL de *Washing Buffer* (TBS1x, 2M urea pH 7.5). Es van afegir 50 µL de *Elution Buffer* (TBS1x 2% SDS) i es va incubar 5 minuts a 90°C. Per últim, amb l'ajuda de l'imant, es va recollir l'elució que contenia les proteïnes prèviament unides a DIF-P o DIF-P8R i es va guardar a -80°C fins al moment de l'anàlisi.

7.3. Electroforesi 1D

Per tal de detectar les proteïnes precipitades juntament amb el pèptid biotinilat, es va dur a terme una electroforesi en una dimensió.

Es va preparar la mostra per a l'electroforesi afegint un 10% d'agent reductor (Nupage Sample Reducing Agent 10X; NP0004, Invitrogen) i un 5% de tampó de càrrega (Nupage SDS Sample Buffer 5X; NP0007, Invitrogen). Les mostres es van incubar durant 10 minuts a 70°C per tal d'afavorir la seva desnaturalització abans de carregar-les al gel de poliacrilamida (NP0321BOX, thermofisher). La cubeta utilitzada per a l'electroforesi va ser la X Cell Surelock Mini-cell (EI001, invitrogen). Aquest sistema està pensat per a córrer simultàniament 2 gels de poliacrilamida. Una vegada muntat, es crea un espai tancat entre ambdós gels, en el qual es van afegir 200 mL de Antioxidant Running Buffer 1X (NuPage Running Buffer 20X, NP0001, al que se li afegien 0,5 mL d'antioxidant Nupage Antioxidant, NP0005, Invitrogen). Aquest buffer ha de cobrir els pouets del gel. A l'espai extern es van afegir 500 mL de Running Buffer 1X (NuPage Running Buffer 20X, NP0001, Invitrogen). Com a marcador de pes molecular es van utilitzar 8 µL de SeeBlue Plus II pre-Stained Standard (LC5925, Invitrogen). Un cop carregats els pouets amb el marcador i les mostres, es va tancar la cubeta i es va connectar a una font de voltatge (Standard Power Pack P25, 040-800, Biometra) i es va ajustar el voltatge a 180V.

7.4. Tinció de plata

Per a fer la tinció de plata del gel es va utilitzar el kit comercial SilverQuest Staining Kit (LC6070, Invitrogen) i es van seguir les instruccions del fabricant. Es tracta d'una tinció que es caracteritza per la seva capacitat de detectar quantitats molt petites de proteïna (fins a dècimes de nanograms).

Per tal d'eliminar les restes dels tampons utilitzats en l'electroforesi del gel, es van realitzar 2 rentats de 5 minuts amb 50 mL d'aigua mQ en agitació. A continuació, es va incubar durant 20 minuts amb 50 mL d'aigua mQ, 40% d'etanol i 10% d'àcid acètic. Després, es va rentar la membrana amb 50 mL d'aigua mQ amb 30% d'etanol durant 10 minuts. Seguidament es van afegir 50 mL de tampó de sensibilització (taula 8) durant 10 minuts i es va continuar amb un rentat amb 50 mL d'aigua mQ amb 30% d'etanol durant 10 minuts i un altre rentat amb 50 mL d'aigua mQ durant 10 minuts més. Per a tenyir el gel, es va incubar durant 15 minuts amb 50 mL de tampó de tinció (taula 8). Seguidament, es va fer un rentat d'un minut amb 50 mL d'aigua mQ i es va prosseguir amb el revelat, afegint 50 mL de tampó de revelat (taula 8) i es va incubar entre 4 i 8 minuts, fins que es va obtenir el contrast desitjat. Per últim, es va neutralitzar el tampó de revelat amb 5 mL de solució de parada (subministrada al kit) durant 10 minuts, després dels quals es va realitzar un últim rentat amb aigua mQ.

Taula 8. Tampons del kit per a la tinció de plata.

Nom del Tampó	Composició
Tampó de sensibilització	30% etanol, 10% <i>Sensitizer</i> , en aigua mQ
Tampó de tinció	0,5 mL <i>Stainer</i> en 50 mL d'aigua mQ
Tampó de revelat	10% de <i>Developer</i> , una gota de potenciador (<i>Enhancer</i>), en aigua mQ

Un cop tenyit el gel, es van identificar aquelles bandes d'interès, es van aïllar i es van analitzar mitjançant espectrometria de masses al servei tècnic de proteòmica del VHIR.

8. Estudis *in vivo*

8.1. Estudis de la funció citostàtica de DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R

Per tal d'estudiar la funció citostàtica *in vivo* dels pèptids DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R, es van realitzar dos procediments diferents en ratolins C57BL/6 i DBA/2N amb tumors preestablerts.

Primerament, es van injectar intradèrmicament 300.000 cèl·lules P815 o B16-F10 en ratolins DBA/2N o C57BL/6, respectivament, i es va monitoritzar el creixement tumoral

en dies alterns fins que el tumor va arribar a una mida d'entre 25 i 50 mm². Un cop assolida aquesta mida, es va realitzar un dels dos procediments explicats a continuació.

8.1.1. Injecció intratumoral dels diferents pèptids

Es van injectar els pèptids intratumoralment a una concentració de 55µM i es va monitoritzar el creixement tumoral en dies alterns durant 2 setmanes o fins que el tumor va arribar a una mida de 200 mm².

8.1.2. Injeccions endovenoses del pèptid DIF-P3K.iRGD

Per a la injecció endovenosa del pèptid DIF-P3K, es van realitzar dos constructes amb el pèptid iRGD, el qual s'ha demostrat ser molt eficaç per a alliberar fàrmacs en els tumors, ja que el pèptid iRGD s'uneix a la integrina V la qual es troba present a la membrana citoplasmàtica de les cèl·lules endotelials dels vasos en neoformació. Un dels constructes contenia la forma cíclica de iRGD, mentre que l'altre contenia la forma lineal. A més a més, ambdós pèptids estaven units a un fluorocrom (Quasar670) per tal de poder fer un seguiment *in vivo* d'aquests i determinar si es dirigeixen al lloc del tumor.

Per a realitzar l'estudi de la funció citostàtica dels pèptids, es van anestesiari els ratolins amb 10 µL/g de pes d'anestèsia via intraperitoneal (taula 9) i, posteriorment, es van injectar endovenosament, per via retroorbital, els diferents pèptids a una concentració de 55µM. A continuació es va fer un seguiment de la localització *in vivo* dels pèptids amb l'ajuda del sistema PhotonIMAGER RT de BioSpace Lab. Aquest seguiment es va realitzar als 5, 10, 15 i 30 minuts. A cada ratolí se li van realitzar 7 injeccions amb 24 hores de separació entre elles. A més a més, es va fer un monitoratge del creixement tumoral en dies alterns durant 2 setmanes posteriors a la darrera injecció o fins que el tumor va arribar a una mida de 200 mm².

Taula 9. Anestèsia Ketamina/Xilacina. Es van injectar 10 µL/g de pes d'anestèsia via intraperitoneal, la qual cosa assegurava una anestèsia de 30-45 minuts.

	Referència	Concentració d'ús
Hidroclorur de Xilacina	Rompún 2% (Bayer)	10 mg/kg de pes
Ketamina 10%	Imalgene 1000 (Richer Pharma)	100 mg/kg de pes

8.2. Estudis de la capacitat adjuvant *in vivo* dels pèptids: Estudis de Mort Cel·lular Immunogènica

En aquests estudis es van utilitzar les línies cel·lulars tumorals P815 i B16-F10 i es va testar la capacitat immunogènica dels pèptids DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R. A més a més, es van utilitzar diverses condicions control: HBSS1X, cèl·lules en *starving* i els pèptids 72 i 72-8R. Els estudis d'*Immunogenic Cell Death* consisteixen en l'administració de cèl·lules tumorals tractades amb agents inductors d'aquest tipus de mort cel·lular, de manera que aquells pèptids capaços d'induir certa protecció enfront al desenvolupament tumoral han de provocar una resposta immune que protegeixi els ratolins contra un desafiament posterior amb cèl·lules tumorals vives del mateix tipus (Figura 16).

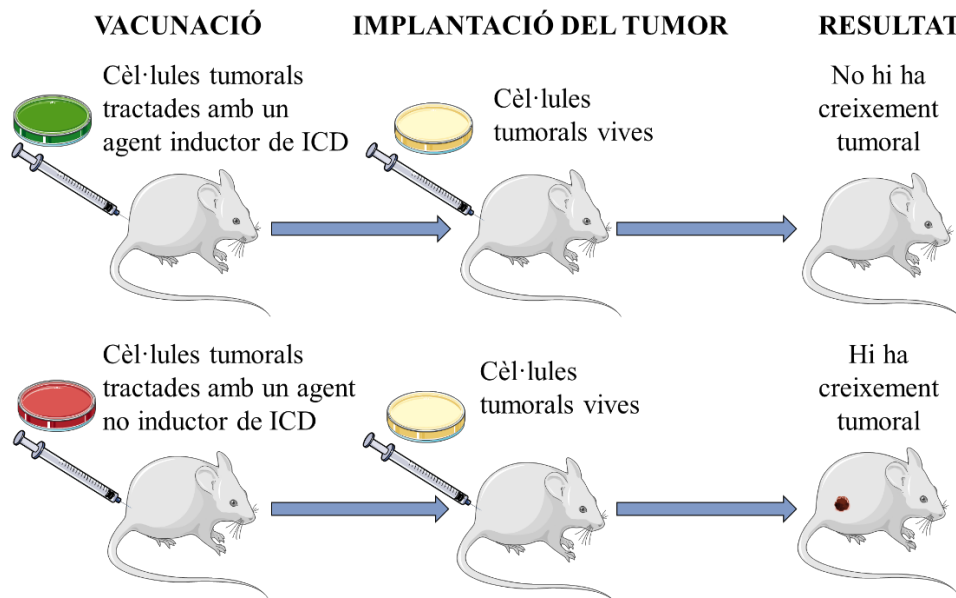


Figura 16. Disseny experimental dels estudis d'*Immunogenic Cell Death*.

Per a les immunitzacions dels ratolins, es van cultivar les cèl·lules a una concentració de 6×10^6 cèl·lules/mL en presència dels diferents pèptids a una concentració de $55 \mu\text{M}$. Aquests cultius es van deixar a l'incubador a 37°C i $5\% \text{CO}_2$ durant diversos temps: 1, 16 i 24 hores. Seguidament, es va comprovar mitjançant un assaig d'annexina V – Iodur de Propí que les cèl·lules presentessin un percentatge de mort superior al 80%. Si es complia aquest criteri, es realitzava una injecció intradèrmica de 300.000 cèl·lules al flanc esquerre (prèviament rasurat) del ratolí amb una agulla de 25G. En aquest flanc no s'espera creixement tumoral. Durant els dies posteriors a la immunització s'espera que els ratolins vacunats amb agents inductors de ICD s'hagin immunitzat enfront les cèl·lules tumorals.

Passats 7 o 15 dies de l'última immunització (segons l'estudi), es realitzava la injecció del *challenge*. Es van injectar per via intradèrmica, amb una agulla de 25G, 300.000 cèl·lules

tumorals vives en el flanc dret del ratolí (prèviament rasurat). Es va monitoritzar el creixement tumoral en dies alterns durant 3 setmanes o fins que el tumor va arribar a una mida de 200 mm². Es van realitzar els estudis d'ICD en les diferents condicions de preparació i d'administració de les immunitzacions descrites a la taula 10.

Taula 10. Condicions dels diversos estudis d'ICD.

Ratolí (Línia cel·lular)	Condicions de cultiu	Temps d'incubació	Congelació a -80°C	Nombre d'immunitzacions	Temps entre injeccions
C57BL/6 (B16-F10)	<i>Starving</i> , 72, 72-8R, DIF-P, DIF-P3K, DIF-P8R	1 hora	No	1	7 dies
C57BL/6 (B16-F10)	<i>Starving</i> , 72, 72-8R, DIF-P, DIF-P3K, DIF-P8R	16 hores	No	1	7 dies
C57BL/6 (B16-F10)	<i>Starving</i> , 72, 72-8R, DIF-P, DIF-P3K, DIF-P8R	24 hores	Sí	1	7 dies
C57BL/6 (B16-F10)	<i>Starving</i> , 72, 72-8R, DIF-P, DIF-P3K, DIF-P8R	24 hores	Sí	3	15 dies
C57BL/6 (B16-F10)	<i>Starving</i> , 72, 72-8R, DIF-P, DIF-P3K, DIF-P8R Tots amb DMSO en cultiu	24 hores	Sí	3	15 dies
C57BL/6 (B16-F10)	DIF-P3K	1 hora	Sí	3	15 dies
C57BL/6 (B16-F10)	DIF-P8R	16 hores	Sí	3	15 dies
C57BL/6 (B16-F10)	DIF-P	24 hores	Sí	6	15 dies
C57BL/6 (B16-F10)	DIF-P + DIF-P3K + DIF-P8R	1 hora + 16 hores + 24 hores	Sí	3	15 dies
DBA2/N (P815)	<i>Starving</i> , 72, 72-8R, DIF-P, DIF-P3K, DIF-P8R	24 hores	No	1	7 dies
DBA2/N (P815)	<i>Starving</i> , 72, 72-8R, DIF-P, DIF-P3K, DIF-P8R	24 hores	No	3	7 dies
DBA2/N (P815)	<i>Starving</i> , 72, 72-8R, DIF-P, DIF-P3K, DIF-P8R	1 hora	Sí	1	7 dies
DBA2/N (P815)	<i>Starving</i> , 72, 72-8R, DIF-P, DIF-P3K, DIF-P8R	16 hores	Sí	1	7 dies
DBA2/N (P815)	DIF-P3K	1 hora	Sí	3	15 dies
DBA2/N (P815)	DIF-P8R	16 hores	Sí	3	15 dies

9. Càlculs estadístics

Els càlculs estadístics es van realitzar amb el programa Prism 7.0 (Graphpad software Inc., San Diego, California, USA).

Per als estudis d'expressió gènica així com per als estudis de la capacitat citotòxica dels pèptids es va utilitzar el test *Two-way ANOVA* amb el test de *Dunnet*. A més a més, en els estudis d'expressió en sang perifèrica dels diferents ratolins, també es va realitzar la comparació de les diferents soques una a una amb un test de *Mann-Whitney*. D'altra banda, per a l'anàlisi estadístic de la progressió tumoral es va realitzar un test de regressió lineal.

RESULTATS

1. Estudi de la implicació del Sistema Nerviós en el desenvolupament de la Diabetis Tipus 1

1.1. Estudi de les alteracions genètiques en DRG de ratolins NOD prediabètics

En aquesta part de l'estudi, es va realitzar un anàlisi funcional de cèl·lules dels DRGs per tal de demostrar la hipòtesi que la T1D podria derivar-se d'un procés neurodegeneratiu en el qual s'alliberarien autoantígens cel·lulars que podrien ser els desencadenants d'una resposta autoimmunitària contra el sistema nerviós, però també contra les cèl·lules β pancreàtiques. Es va utilitzar la tecnologia dels microarrays per tal de comparar els perfils d'expressió gènica de ratolins de tres afeccions diferents: ratolins sans (ratolins C57BL/6), ratolins amb predisposició a desenvolupar T1D (ratolins NOD) i ratolins immunodeficients però amb predisposició a desenvolupar la malaltia (ratolins NOD.Rag2^{-/-}). Es va realitzar un anàlisi del transcriptoma per tal de determinar la causa suposada i/o les molècules implicades en aquest hipotètic procés neurodegeneratiu.

1.1.1. Anàlisi bioinformàtic dels resultats dels microarrays

Donat que es realitzaven diversos anàlisis comparatius (C57BL/6 vs. NOD, C57BL/6 vs. NOD.Rag2^{-/-} i NOD vs. NOD.Rag2^{-/-}, tant a les 3 com a les 12 setmanes d'edat), era interessant buscar patrons similars entre les diferents condicions experimentals. Per a fer-ho es va realitzar una agrupació jeràrquica (en anglès, *hierarchical clustering*) dels gens tal i com s'ha descrit a *Materials i Mètodes*. Cada clúster o agrupació va representar-se en un *heatmap* (figura 17), en el qual es demostra que els ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-} tenen un perfil d'expressió gènica similar però diferent del perfil dels ratolins C57BL/6, tant a les 3 com a les 12 setmanes d'edat. No es van observar diferències d'expressió al comparar la mateixa soca a diferents temps (figura 1, Annex). En conjunt, aquests resultats indiquen que les diferències en l'expressió són degudes al background genètic de les diferents soques de ratolí amb independència de l'edat dels animals.

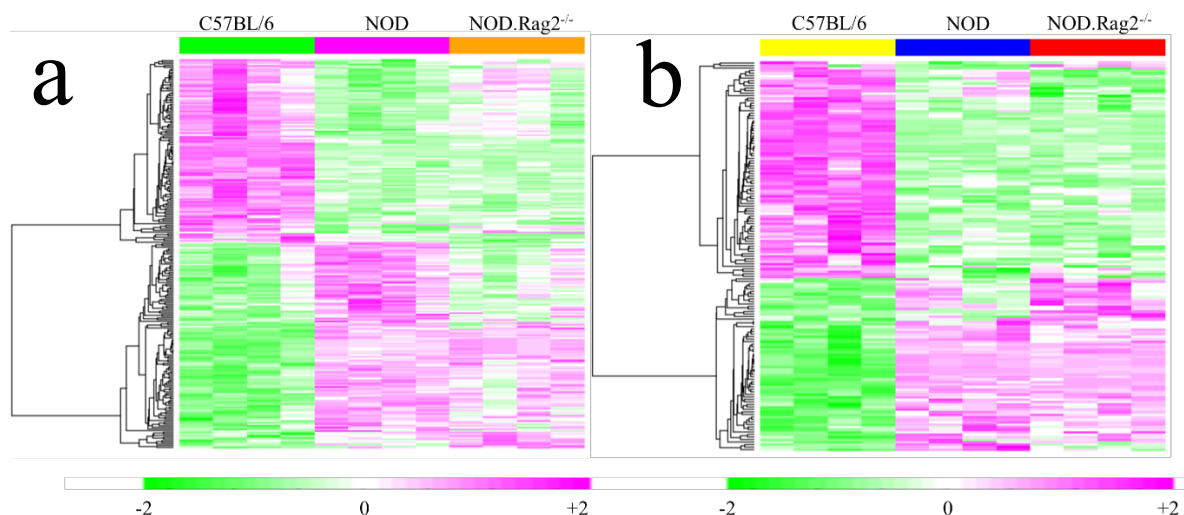


Figura 17. *Heatmaps* que representen una agrupació jeràrquica de gens. Els clústers amb valors d'expressió baixos es representen en verd, mentre que els que tenen valors d'expressió elevats es representen en violeta. (a) Anàlisi comparativa de l'expressió gènica entre ratolins C57BL/6, NOD i NOD.Rag2^{-/-} de 3 setmanes d'edat. (b) Anàlisi comparativa de l'expressió gènica entre ratolins C57BL/6, NOD i NOD.Rag2^{-/-} de 12 setmanes d'edat.

Una vegada identificats els gens que estaven expressats diferencialment, es van analitzar separatament per tal de conèixer en quins processos biològics estaven aquests implicats. També es va realitzar un anàlisi d'enriquiment per tal d'identificar si hi havia alguna categoria biològica alterada en les soques amb predisposició al desenvolupament de T1D.

Els anàlisis van mostrar que a les 3 setmanes d'edat, 80 gens es trobaven expressats de manera diferencial entre soques (taula 1, *Annex*). D'entre aquests, es van identificar 31 seqüències de ADNc que encara no tenien associada cap funció: 1 *small nuclear RNA*, 2 microRNAs, 6 ARNs no codificants, 6 pseudogens, i 16 gens predits però sense cap proteïna associada. Tal i com es mostra en la taula 11, la classificació segons la funció dels gens basada en informació proporcionada per la literatura mostrava que els 49 gens restants identificats per anàlisi de microarrays es correlacionaven amb: a) la inflamació (*Fau*, *Hist1h2b*, *Ly86*, *Mmp25* i *Pianp*) i la resposta immune adaptativa (*Igk*, *H2-T22* i *Ifna4*); b) la senyalització, principalment a través de receptors acoblats a proteïnes G o GPCR (*Mrgpra2a*, *Mrgpra2b*, *Mrgprb4*, *Mrgprx1* i *Olfr1269*) però també d'altres vies de senyalització (*Gabra2* i *Scg5* -senyament de neuropèptids- i *Srp54c*); c) el transport (*Arl8a* -transport axonal-, *Slco1c1*, *Trpc3*, *Tmem203* -transport d'ions i homeòstasi-, *Slc35a5*, *Slc39a8* -transport transmembrana- i *Tglon1* -transport Golgi/membrana); d) la síntesi de proteïnes (*Rpl29*, *Rpl3*, *Rpl34* i *Rps12*), i la seva maduració (*Cisd3*, *Cst12*, *Hddc3*, *Mamdc2* i *Mettl7a3*) i degradació a través de la via UBL (*Vcp*); e) altres processos metabòlics

(*Abhd1*, *Ahcy*, *Alad*, *Gnpda1*, *Gsto1*, *Mmp25*, *Ppp1r3e* i *Scg5*); f) el cicle cel·lular (*Hjurp*, *Psmc3ip* i *Pttg1*); g) la resposta de reparació de l'ADN (*Pttg1* i *Vcp*); h) proteïnes relacionades amb la transcripció (*Samd11*); i) proteïnes antioxidants i d'estrès oxidatiu (*Gsto1*); i j) la diferenciació i proliferació cel·lular (*Osr2* i *Erdr1*) i la mort cel·lular (*Itgb3bp* i *Vcp*). També es van trobar expressats diferencialment dos gens que codifiquen proteïnes musculars (*Tpm3* i *Zfp125*) i cinc proteïnes de membrana sense una funció clara definida (*Ostc*, *Tmem254a*, *Tmem254b*, *Tmem254c* i *Tmem72*).

A les 12 setmanes d'edat, van identificar-se 86 gens expressats de manera diferencial entre soques, dels quals 61 també tenien alterada la seva expressió a les 3 setmanes d'edat mentre que 25 s'expressaven de manera diferencial només en aquest estadi prediabètic tardà (taula 1, Annex). Es van identificar 9 pseudogens, 3 ARNs no codificants i 2 RIKEN cDNAs, 1 *small nucleolar* RNA, 14 gens predits i 6 seqüències sense cap mena d'informació. Tal i com es mostra en la taula 11, els gens restants estaven relacionats amb: a) la immunitat innata (*Ahcy*, *Fau*, *Hist1h2b* i *Mmp25*) i adaptativa (*H2-T22*, *Ifna4* i *Nts*); b) la senyalització a través de GPCR (*Mrgpra3/4*, *Myo7a*, *Nts*, *Mrgpra2a/2b* i *Olf1r1269*) així com a través d'altres vies (*Scg5* –senyalització per neuropèptids– *Mid1* i *Srp54c*); c) el transport (*Arl8a* –transport axonal–, *Heatr5b* –transport retrògrad i endocitosi– i *Slc39a8* –transport transmembrana); d) la síntesi (*Rpl29*, *Rpl3*, *Rpl34* i *Rps12*), maduració (*Cst12*, *Mettl7a3* i *Tgm5*) i degradació de proteïnes (*Hspe1* i *Vcp*); e) altres processos metabòlics (*Abhd1*, *Ahcy*, *Fbp2*, *Gnpda1*, *Gsto1*, *Pla2g4e*, *Ppp1r3e* i *Scg5*); f) el cicle cel·lular (*Hjurp*, *Psmc3ip* i *Pttg1*); g) respostes de reparació del ADN (*Pttg1* i *Vcp*); h) proteïnes relacionades amb la transcripció (*Psmc3ip* i *Samd11*); i) proteïnes antioxidants i d'estrès oxidatiu (*Gsto1* i *P4ha3*); la resposta a estímuls com la insulina (*H2afz*) o l'estrès osmòtic (*Map7*); j) la diferenciació cel·lular (*Map7* i *Lect1*); i k) la mort cel·lular (*Vcp*). En aquesta edat, també es van trobar expressats diferencialment dos gens que codifiquen dues proteïnes musculars (*Tpm3* i *Zfp125*) i set proteïnes de membrana sense una funció clara definida (*Ostc*, *Nxpe2*, *Tmem132c*, *Tmem254a*, *Tmem254b*, *Tmem254c* i *Tmem40*).

Taula 11. Procés biològic en el que estan implicats els diversos gens diferencialment expressats, tant a les 3 com a les 12 setmanes d'edat.

Procés biològic	Gens	
	3 setmanes d'edat	12 setmanes d'edat
Immunitat innata i inflamació	<i>Fau, Hist1h2b, Ly86, Mmp25, Pianp</i>	<i>Ahcy, Fau, Hist1h2b, Mmp25</i>
Immunitat adaptativa	<i>Igk, H2-T22, Ifna4</i>	<i>H2-T22, Ifna4, Nts</i>
Senyalització cel·lular A través de GCPR A través de neuropèptids Altres	<i>Mrgpra2a, Mrgpra2b, Mrgprb4, Mrgprx1, Olfr1269</i> <i>Gabra2, Scg5</i> <i>Srp54c</i>	<i>Mrgpra3/4, Myo7a, Nts, Mrgpra2a/2b, Olfr1269</i> <i>Scg5</i> <i>Mid1, Srp54c</i>
Transport Transport axonal Transport de ions i homeòstasis Transport transmembrana Transport Golgi-Membrana Transport retrògrad	<i>Arl8a</i> <i>Slco1c1, Trpc3, Tmem203</i> <i>Slc35a5, Slc39a8</i> <i>Tglon1</i>	<i>Arl8a</i> <i>Slc39a8</i> <i>Heatr5b</i>
Síntesi de proteïnes	<i>Rpl29, Rpl3, Rpl34, Rps12</i>	<i>Rpl29, Rpl3, Rpl34, Rps12</i>
Maduració de proteïnes	<i>Cst12, Hddc3, Mamdc2, Mettl7a3</i>	<i>Cst12, Mettl7a3, Tgm5</i>
Degradació de proteïnes (via UBL)	<i>Cisd3, Vcp</i>	<i>Hspe1, Vcp</i>
Processos metabòlics	<i>Abhd1, Ahcy, Alad, Gnpdal, Gsto1, Mmp25, Ppp1r3e, Scg5</i>	<i>Abhd1, Ahcy, Fbp2, Gnpdal, Gsto1, Pla2g4e, Ppp1r3e, Scg5</i>
Cicle cel·lular	<i>Hjurp, Psmc3ip, Pttg1</i>	<i>Hjurp, Psmc3ip, Pttg1</i>
Reparació de l'ADN	<i>Pttg1, Vcp</i>	<i>Pttg1, Vcp</i>
Proteïnes relacionades amb la transcripció	<i>Psmc3ip, Samd11</i>	<i>Psmc3ip, Samd11</i>
Estrés oxidatiu i resposta antioxidant	<i>Gsto1</i>	<i>Gsto1, P4ha3</i>
Resposta a estímuls Insulina Estrés osmòtic	<i>H2afz</i> <i>Map7</i>	
Diferenciació cel·lular i proliferació	<i>Osr2, Erdr1</i>	<i>Map7, Lect1</i>
Mort cel·lular	<i>Itgb3bp, Vcp</i>	<i>Vcp</i>
Proteïnes musculars	<i>Tpm3, Zfp125</i>	<i>Tpm3, Zfp125</i>
Proteïnes de membrana sense funció clara definida	<i>Ostc, Tmem254a, Tmem254b, Tmem254c, Tmem72</i>	<i>Ostc, Nxpe2, Tmem132c, Tmem254a, Tmem254b, Tmem254c, Tmem40</i>

Alguns dels gens identificats estaven relacionats amb més d'una categoria. Per exemple, la *Vcp* està implicada en: a) la formació del reticle endoplasmàtic transicional (tER); b) juntament amb *Nploc4* i *Ufd1l* regula el desmuntatge del fus mitòtic i és necessària per a la formació d'un embolcall nuclear tancat; c) participa en la resposta al dany a l'ADN i es

recluta als llocs de DSB (de l'anglès, *Double Strand Break*); d) participa en la degradació de proteïnes ubiquitinades; i e) interactua de forma selectiva i no covalent amb les principals molècules de MHC-I. El conjunt de funcions de tots els gens on es va detectar una expressió diferencial entre grups es troben resumides a la taula 2 de l'*Annex*.

A banda d'identificar la funció associada a les proteïnes diferencialment expressades, es van realitzar anàlisis d'enriquiment (detallats a *Materials i Mètodes*) per tal de conèixer si, dins de la nostra llista de gens diferencialment expressats, existia algun procés biològic, funció molecular, component cel·lular o via de senyalització que es trobés més repetida de l'esperat. Tant a les 3 com a les 12 setmanes, tots els valors FDR eren superiors a 0.05, però es podia observar una tendència (FDR=0.05-0.1) d'enriquiment de les proteïnes ribosomals. A més a més, a les 12 setmanes d'edat, hi havia una tendència d'enriquiment en els gens relacionats amb el processament i presentació d'antígens.

A continuació, es va utilitzar *TIDBase* per tal de determinar quins dels gens candidats (tant a les 3 com a les 12 setmanes) havien estat prèviament relacionats amb locus Idd (de l'anglès, *Insulin Dependent Diabetes*). També es va utilitzar l'eina BLAST de NCBI per tal de conèixer el percentatge d'homologia entre els gens murins i els seus homòlegs humans. Els resultats, resumits en la taula 12, indiquen que 30 dels gens expressats diferencialment es troben dins o a prop ($\pm 0.5\text{Mb}$) d'un locus Idd. D'aquests, 23 gens tenen un homòleg humà identificat (18 d'ells amb una homologia superior al 80%). Tot i així, d'aquests 23, només 2 estan a prop d'un locus IDDM (de l'anglès *Insulin Dependent Diabetes Mellitus*).

Taula 12. Gens identificats que estan associats a un locus de susceptibilitat a diabetis.

Gens candidats		Localització		Homologia (%)
Símbol	Nom	Humans	Murins	
<i>Ahcy</i>	<i>S-adenosyl-homocysteine hydrolase</i>	20q11.22	2 H1; 2 76.94cM Idd13	91
<i>Arl8a</i>	<i>ADP-ribosylation factor-like 8A</i>	1; 1 F	1; 1 F Idd5.4	93
<i>Arntl2</i>	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2</i>	12p12.2-p11.2	6; 6 G3 Idd6.3	-
<i>BC023719</i>	<i>cDNA sequence BC023719</i>	-	17 Idd24	-
<i>Cldn9</i>	<i>Claudin 9</i>	16p13.3	17; 17 A3.3 Idd23	87
<i>Crym</i>	<i>Crystallin mu</i>	16p12.2	7 F2; 7 64.47cM Idd27 ($\pm 0.5\text{Mb}$)	87
<i>Cst12</i>	<i>Cystatin 12</i>	-	Idd13	-

Continuació taula 12. Gens identificats que estan associats a un locus de susceptibilitat a diabetis.

Gens candidats		Localització		Homologia (%)
Símbol	Nom	Humans	Murins	
<i>D430036</i> <i>J16Rik</i>	<i>RIKEN cDNA D430036J16</i> <i>gene</i>	-	9; 9 Idd2	-
<i>Exosc9</i>	<i>Exosome component 9</i>	4q27 IDDM12 (±0.5Mb)	3; 3 B Idd3	89
<i>Fau</i>	<i>Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived)</i>	11q13	19 A; 19 4.34cM Idd13	-
<i>Fbp2</i>	<i>Fructose biphosphatase 2</i>	9q22.3	13; 13 B3 Idd14	87
<i>Gm13139</i>	<i>Predicted gene 13139</i>	-	4; 4 E1 Idd9.2	-
<i>Gm14057</i>	<i>Predicted gene 14057</i>	-	2 F1; 2 Idd13	-
<i>H2-22</i>	<i>Histocompatibility 2, T region locus 22</i>	-	17 B1; 17 18.87cM Idd24	-
<i>Hddc3</i>	<i>HD domain containing 3</i>	15q26.1	7; 7 D3 Idd27	87
<i>Hjrup</i>	<i>Holliday junction recognition protein</i>	2q37.1	1; 1 D Idd5.4a	-
<i>Ly86</i>	<i>Lymphocyte antigen 86</i>	6p25.1	13; 13 A3.3 Idd14	-
<i>Mmp25</i>	<i>Matrix metallopeptidase 25</i>	16p13.3	17; 17 A3.3 Idd23	-
<i>Myo7a</i>	<i>Myosin VIIA</i>	11q13.5	7 E2; 7 53.57cM Idd27	89
<i>Ndufa11</i>	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11</i>	19p13.3	17; 17 D Idd23	-
<i>Nxpe2</i>	<i>Neurexophilin and PC-esterase domain family, member 2</i>	11q23.3	9; 9 A5.3 Idd2	80
<i>P4ha3</i>	<i>Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide III</i>	11q13.4	7; 7 E3 Idd27	88
<i>Pianp</i>	<i>PILR alpha associated neural protein</i>	12p13.31	6; 6 F2 Idd19	87
<i>Pla2g4e</i>	<i>Phospholipase A2, group IVE</i>	15q15.1	2; 2 E5 Idd13	83
<i>Rps12</i>	<i>Ribosomal protein S12</i>	6q23.2	69F5-69F5 Idd13	90
<i>Scg5</i>	<i>Secretogranin V</i>	15q13-q14	2 57.45cM; 2 E5 Idd13 (±0.5Mb)	81
<i>Slco1c1</i>	<i>Solute carrier organic anion transporter</i>	12p12.2	6; 6 G1 Idd6.2	84

Continuació taula 12. Gens identificats que estan associats a un locus de susceptibilitat a diabetis.

Gens candidats		Localització		Homologia (%)
Símbol	Nom	Humans	Murins	
<i>Tgm5</i>	<i>Transglutaminase 5</i>	15q15.2	2; 2 E5 Idd13	85
<i>Trpc3</i>	<i>Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 3</i>	4q27 IDDM12 (± 0.5 Mb)	3B; 3 17.93cM Idd3	87
<i>Vcp</i>	<i>Valosin containing protein</i>	9p13.3	4 A5; 4 22.95cM	89

1.1.2. Selecció de gens per a la confirmació mitjançant RT-qPCR

Per tal de confirmar els resultats dels microarrays, es va realitzar un anàlisi d'expressió genètica mitjançant RT-qPCR en un petit grup de gens, entre els quals hi havia representació de diverses funcions cel·lulars. Els gens seleccionats complien els següents requisits:

- Tenien un *adjusted p-value* menor de 0.01, almenys en la comparació en una de les edats (3 o 12 setmanes).
- Estaven associats a un locus Idd.
- Tenien un homòleg humà.

Taula 13. Principals característiques dels gens seleccionats per a la comprovació mitjançant qPCR.

Gens seleccionats		Nivells d'expressió en ratolins NOD i NOD.Rag2 ^{-/-}	Procés biològic associat	Locus Idd	Homologia (%)
Símbol	Nom				
<i>Ahcy</i>	<i>S-adenosyl-homocysteine hydrolase</i>	↑	Biosíntesi d'homocisteïna	Idd13	91
<i>Arl8a</i>	<i>ADP-ribosylation factor-like 8A</i>	↓	Segregació de cromosomes (cicle cel·lular)	Idd5.4	93
<i>Rps12</i>	<i>Ribosomal protein S12</i>	↓	Síntesi de proteïnes	Idd13	90
<i>Scg5</i>	<i>Secretogranin V</i>	↑	Metabolisme	Idd13 (± 0.5 Mb)	81
<i>Vcp</i>	<i>Valosin Containing Protein</i>	↓	Via UBL	-	89

↓: Menors nivells de transcripció en ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-} en comparació amb els ratolins C57BL/6.

↑: Majors nivells de transcripció en ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-} en comparació amb ratolins C57BL/6.

L'únic gen que no complia tots els criteris era el gen *Vcp* (de l'anglès, *Valosin Containing Protein*). Tot i que no estava associat a un locus Idd, es va seleccionar degut al seu baix

valor p en tots els anàlisis comparatius. En la taula 13 s'han descrit les principals característiques dels gens seleccionats.

1.1.3. Estudi de l'expressió dels gens seleccionats en cèl·lules dels DRG

Al contrari del que esperàvem, els resultats dels assaigs per RT-qPCR, els quals es troben resumits en la figura 18, no van reproduir els resultats dels microarrays en tots els gens analitzats.

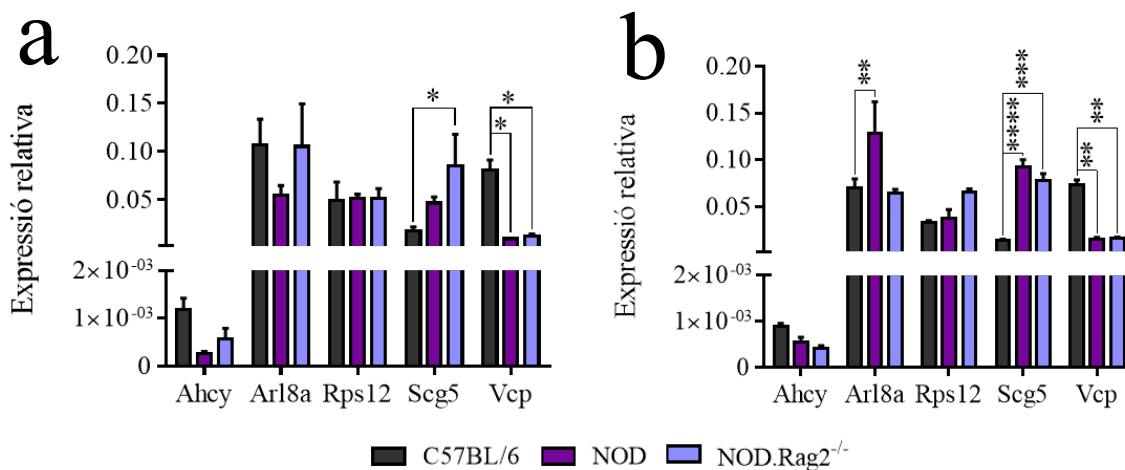


Figura 18. Nivells d'expressió relativa detectats en els assaigs de RT-qPCR en les cèl·lules dels DRG de ratolins C57BL/6, NOD i NOD.Rag2^{-/-} a les 3 setmanes (a) i a les 12 setmanes (b) d'edat. n=4 * p=0,01 ** p=0,001 *** p=0,0005 ****p=0,0001

Mentre que en els microarrays els nivells d'expressió de *Ahcy* van ser més elevats en els ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-} que en els ratolins C57BL/6, els resultats de les RT-qPCR van mostrar una expressió relativa superior en aquests últims. Encara que aquesta diferència no va ser significativa en cap de les dues edats estudiades, sí que es va observar una tendència a ser-ho. Pel que fa als nivells d'expressió de *Arl8a* i *Rps12*, malgrat els microarrays suggerien que els ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-} tenen uns nivells d'expressió inferiors que els ratolins C57BL/6, els resultats dels assaig per RT-qPCR a les 3 setmanes d'edat no van mostrar diferències entre els grups. A més a més, els ratolins NOD de 12 setmanes semblaven expressar nivells més elevats d'*Arl8a* (p=0,001). Tot i que les diferències d'expressió de *Scg5* a les 3 setmanes només van ser significatives en la comparació del control amb els ratolins NOD.Rag2^{-/-} (p=0,01), també vam observar una tendència a que els seus nivells fossin més elevats en els ratolins NOD en aquesta mateixa edat. Amb el pas del temps, els nivells d'expressió de *Scg5* d'aquests ratolins (p=0,0001) així com dels ratolins NOD.Rag2^{-/-} (p=0,0005) van esdevenir clarament més elevats que els valors dels ratolins C57BL/6. Per últim, els assaigs per RT-qPCR van confirmar les diferències en els

nivells de ARNm del gen *Vcp*. Aquests eren més elevats en els ratolins C57BL/6 que en els ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-}, tant a les 3 (p=0,01) com a les 12 setmanes (p=0,001) d'edat.

1.2. Estudi de les alteracions genètiques en sang perifèrica de ratolins NOD prediabètics

Tal i com s'ha mostrat en apartats anteriors, el nostre estudi suggereix la presència d'alteracions en la expressió genètica de les cèl·lules dels DRGs de ratolins genèticament susceptibles a desenvolupar diabetis. Això representa un canvi en la manera d'entendre la T1D, ja que fins ara s'havia considerat una malaltia autoimmunitària òrgan específica que només afectava a les cèl·lules β pancreàtiques. Per veure si aquests defectes d'expressió eren exclusius de les cèl·lules dels DRGs, es van realitzar estudis d'expressió d'aquests mateixos gens en leucòcits de sang perifèrica mitjançant la tècnica de la RT-qPCR. A més a més, degut a la facilitat d'obtenció de la mostra en comparació amb els DRGs, es van afegir a l'estudi mostres d'altres soques de ratolí. Així l'estudi d'expressió genètica a nivell de leucòcits de sang perifèrica es va realitzar a ratolins de les soques C57BL/6, NOD, CD1, FVB i SJL. D'aquesta manera es va intentar examinar si algun dels gens estudiats podia ser determinant de l'autoimmunitat que deriva a l'aparició de diabetis tipus 1 (característica dels ratolins NOD) i, per altra banda, si aquesta diferència podia ser detectada amb una simple anàlisi a nivell de sang perifèrica.

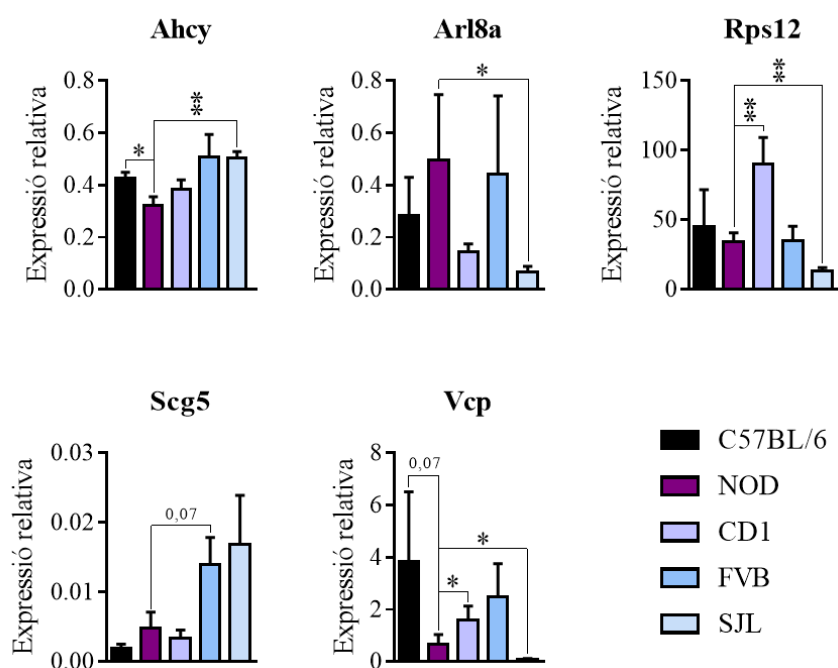


Figura 19. Nivells d'expressió relativa detectats en els assaigs de RT-qPCR de cèl·lules de la sang perifèrica de ratolins C57BL/6, NOD, CD1, FVB i SJL de 3 setmanes d'edat. n=5.

Al realitzar un anàlisi estadístic del tipus *One-way ANOVA*, les diferències d'expressió entre els ratolins NOD i la resta de soques estudiades no eren estadísticament significatives en cap dels casos. En canvi, quan es feia una comparació per *t-test*, en la qual es comparen els nivells d'expressió relativa en el ratolí NOD amb la resta de soques una a una, sí que s'observaven alguns canvis estadísticament significatius. És per això que, d'ara en endavant, es farà referència a aquests últims quan es parli de valors significatius. A més a més, tot i que en alguns casos no hi ha diferències estadísticament significatives, es poden observar algunes tendències a nivell d'expressió.

Tal i com es mostra en la figura 19, es va observar una menor expressió del gen *Ahcy* en els ratolins NOD respecte la resta de soques. Aquestes diferències van ser estadísticament significatives en dos dels casos, en els ratolins C57BL/6 ($p=0,02$) i en els ratolins SJL ($p=0,004$). En canvi, pel que fa al gen *Arl8a*, vam observar que la seva expressió era més alta en els ratolins NOD que en la majoria de les altres soques, malgrat que les diferències només van ser significatives quan es van comparar amb els ratolins SJL ($p=0,02$). Pel que fa als nivells de ARNm de *Rps12* vam observar que mentre aquests eren semblants en els ratolins NOD i FVB, aquests eren més alts en la soca no CD1 ($p=0,008$), i en canvi més baixos a la soca SJL ($p=0,004$), en comparació a la soca NOD. En relació al gen *Scg5*, els nivells d'expressió més alts es van observar en les soques FVB, SJL, i NOD amb predisposició a desenvolupar autoimmunitat, tot i que en els ratolins NOD els nivells observats van ésser només lleugerament més alts (i no estadísticament significatius) que en els ratolins CD1 i C57BL/6. Finalment, l'expressió de *Vcp* en ratolins NOD era més baixa que en els ratolins CD1 ($p=0,05$), C57BL/6 ($p=0,07$) i FVB ($p=0,1$), però més elevada que en els ratolins SJL ($p=0,03$).

En resum, els resultats indiquen que en ratolins NOD els nivells d'expressió dels gens *Ahcy* i *Vcp* són més baixos en els leucòcits de sang perifèrica dels ratolins NOD que en la majoria de les altres soques estudiades, mentre que els gens *Arl8a*, i *Scg5* s'expressen de manera més alta en els ratolins NOD que en la majoria de les altres soques.

1.3. Estudi de les alteracions a nivell sistèmic en mostres de sang humanes

Per tal de demostrar que en humans la T1D és també una malaltia multisistèmica en la que no només hi ha alteracions d'expressió genètica en les cèl·lules β pancreàtiques, sinó que aquestes es troben en diversos tipus cel·lulars, es va realitzar un estudi d'expressió de 4 dels gens candidats (*Ahcy*, *Rps12*, *Scg5* i *Vcp*) en sang perifèrica provinent de pacients

controls i pacients diabètics. En 3 dels 4 gens, es van poder analitzar els nivells de ADNc, mentre que en el gen *Scg5* aquests no eren suficientment elevats com per detectar-los a través de la tècnica utilitzada. És per això que, en aquest cas, es van analitzar els nivells de proteïna en sèrum mitjançant un ELISA.

Tal i com es mostra en la figura 20, l'expressió de tots els gens analitzats va resultar ser en general més baixa en dones, ja fossin sanes o diabètiques. Malgrat que vam observar una tendència diferencial en l'expressió de tots els gens entre controls sans i malalts, independentment del sexe, només les diferències van ser estadísticament significatives en el cas del gen *Vcp* ($p=0,03$). Així doncs, els resultats indiquen que els leucòcits de la sang de pacients diabètics tenen nivells més alts de ARNm de *Vcp* que els dels controls sans. També sembla que els nivells de ARNm del gen *Rps12* tenen tendència a ser més elevats en pacients diabètics que en persones sanes, encara que aquesta diferència no és estadísticament significativa. Finalment, els nivells de ARNm de *Ahcy* semblen ser més elevats en pacients control, essent aquesta tendència més clara en homes que en dones.

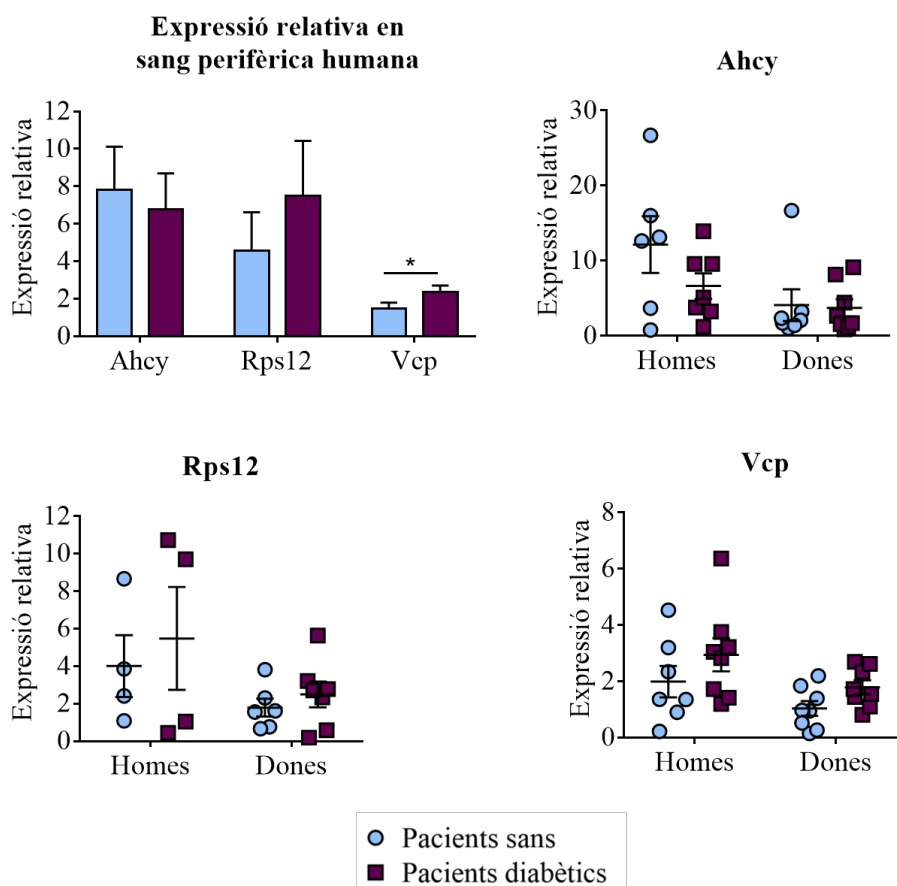


Figura 20. Nivells d'expressió relativa detectats amb els assaigs de RT-qPCR en leucòcits de sang perifèrica de pacients sans i pacients diabètics. $n=15$.

Pel que fa als nivells de *Scg5*, es van analitzar els nivells de proteïna en sèrum mitjançant la tècnica ELISA, ja que els valors de ARNm en cèl·lules de sang perifèrica no eren suficientment elevats per tal de ser detectats mitjançant la tècnica RT-qPCR utilitzada en l'anàlisi de l'expressió de la resta de gens. Tal i com es mostra en la figura 21, no es van apreciar diferències estadísticament significatives en els nivells de proteïna entre els controls sans i pacients diabètics. Curiosament, els valors dels pacients diabètics presentaven una gran dispersió (desviació estàndard) en comparació amb els observats en els controls sans, els quals presentaven concentracions de Secretogranina V en sèrum molt més similars entre ells. Aquesta dispersió dels nivells de Secretogranina V va ser molt més remarcable en les dones diabètiques.

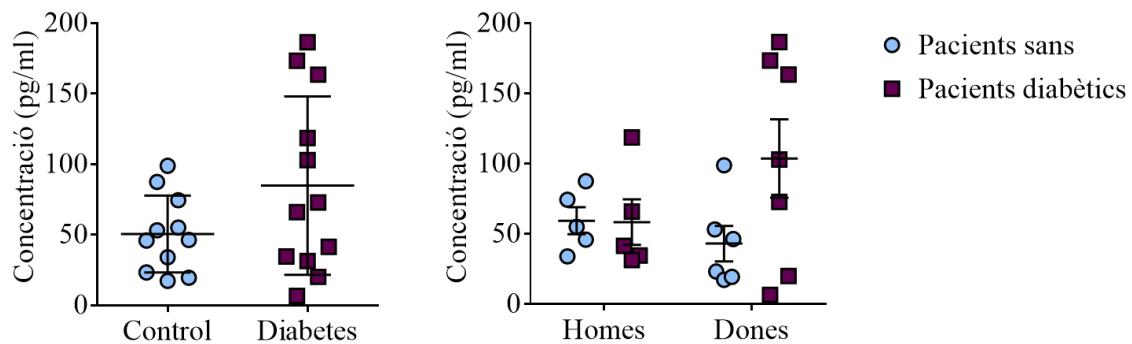


Figura 21. Nivells de Secretogranina V detectats en el sèrum de les persones de control sanes i en els pacients diabètics. n=12.

2. Estudi de la capacitat citotòxica i immunoestimuladora dels pèptids derivats de la Periferina

2.1. Estudis in vitro de la capacitat citotòxica dels pèptids

Estudis previs del nostre laboratori van permetre acotar la seqüència funcional exacta de DIF-P (figura 15, *Introducció*). Es tracta d'un fragment de 9 aminoàcids, la seqüència del qual es troba molt conservada en la coil 2B de la majoria dels filaments intermedis (tot i que amb alguns canvis aminoacídics en alguns d'ells). A més a més, es va poder determinar que l'efecte citotòxic de DIF-P era major quan a aquest se li afegia una cua de 3 lisines (DIF-P3K) o de 8 arginines (DIF-P8R)²¹⁶. En la majoria d'aquests estudis *in vitro* es va utilitzar la línia cel·lular NALM-6. En aquesta tesi, es va voler seguir estudiant les diverses característiques de DIF-P i les seves variants. Per fer-ho, es va seguir utilitzant la mateixa línia cel·lular que es feia servir en els estudis previs, la línia NALM-6.

En bona part dels estudis realitzats en la present tesi, s'ha analitzat la capacitat de diferents pèptids d'induir mort cel·lular, mitjançant l'anàlisi de l'expressió d'Annexina V a la part externa de la membrana cel·lular i de la permeabilitat cel·lular mitjançant la tinció de Iodur de Propidi. En la imatge 22 es mostra un gràfic representatiu de les diferents tincions que pot assolir una cèl·lula segons el seu estat vital després de realitzar aquesta tinció.

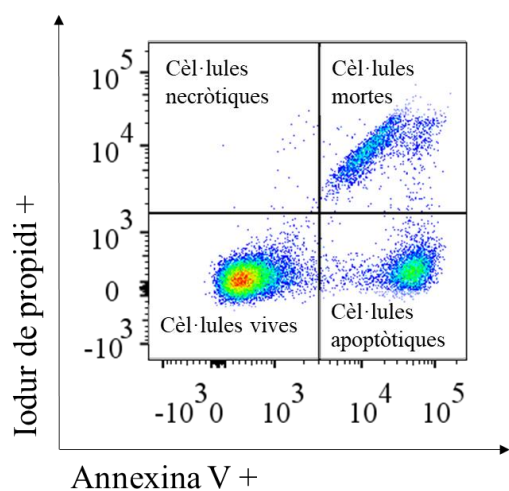


Figura 22. Imatge representativa de l'anàlisi de cèl·lules apoptòtiques. Cèl·lules NALM-6 cultivades amb presència d'un agent inductor d'apoptosi durant 24 hores i tenyides posteriorment amb Annexina V i IP, de manera que es pot diferenciar entre les fases d'apoptosi i mort cel·lular.

Tots els pèptids utilitzats en aquest estudi van ser sintetitzats pel servei de síntesi de pèptids de la Universitat Pompeu Fabra i, a no ser que es faci menció del contrari, estaven diluïts en H₂OmQ.

2.1.1. Estudi de l'efecte citotòxic dosi-dependent dels pèptids derivats de la periferina

2.1.1.1. Cèl·lules NALM-6

Per tal d'analitzar si l'efecte apoptòtic dels diversos pèptids derivats de la periferina era dosi dependent, es van realitzar cultius de la línia cel·lular NALM-6 amb els diferents pèptids (DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R) a diverses concentracions i es va analitzar el seu efecte a dos temps: 1 hora (figura 23a) i 24 hores (figura 23b). Com a controls negatius, es va utilitzar el pèptid 72, provinent d'una altra regió de la periferina sense efecte citotòxic, així com també cèl·lules sense cap mena d'estímul.

Vam observar que el pèptid DIF-P, a una concentració de 55 μ M, induïa una lleugera mortalitat en les cèl·lules NALM-6 en comparació amb els controls negatius (sense pèptid i pèptid 72). Només amb 1 hora de cultiu el percentatge de cèl·lules vives (negatives tant per annexina com per IP) es reduïa del 95% al 75% ($p=0,0001$). El nombre de cèl·lules mortes (positives per annexina i per IP) era del 18% en contraposició als valors del voltant del 3% en els controls ($p=0,0003$), i el de cèl·lules apoptòtiques (positives per annexina però negatives per IP) augmentava del 1,3% fins a una mica més del 7%, malgrat aquest augment no era estadísticament significatiu. A les 24 hores de cultiu, els resultats eren molt similars.

Estudis previs del nostre laboratori ja havien demostrat que els efectes citotòxics de DIF-P es veien augmentats quan a aquest se li afegia una cua de 3 lisines o de 8 arginines. En aquest treball es va voler determinar si aquest efecte era dependent de dosi. D'aquesta manera, el pèptid DIF-P3K a una concentració de 55 μ M induïa, durant la primera hora de cultiu, una disminució d'aproximadament el 50% de cèl·lules vives respecte els controls negatius ($p=0,0001$). Això era degut a un augment, principalment, en el nombre de cèl·lules apoptòtiques (50,6%, $p=0,0001$). El nombre de cèl·lules mortes, en canvi, no augmentava de manera significativa, passant d'un 3,5% en els controls a un 6,5%. Malgrat que, després d'una hora de cultiu, el nombre de cèl·lules apoptòtiques era menor al diluir DIF-P3K a 5,5 μ M, aquest seguia sent estadísticament significatiu en comparació amb els controls negatius (12,6%, $p=0,006$). El augment en el nombre de cèl·lules mortes, en canvi, seguia essent molt baix (7,7%) i no significatiu. A les 24 hores de cultiu, el nombre de cèl·lules mortes augmentava en ambdues concentracions, essent del 27% quan el pèptid es troba a una concentració de 55 μ M ($p=0,0001$) i del 12,5% quan el diluïem 10 vegades ($p=0,0001$). El nombre de cèl·lules apoptòtiques també va augmentar en ambdós casos, essent del 62,8% ($p=0,0001$) i el 22,9% ($p=0,0001$), respectivament. Malgrat aquest pèptid seguia

tenint cert efecte citotòxic a una concentració més baixa (5,5 μM), aquest es veia clarament reduït, recordant a l'efecte del pèptid DIF-P a una concentració de 55 μM .

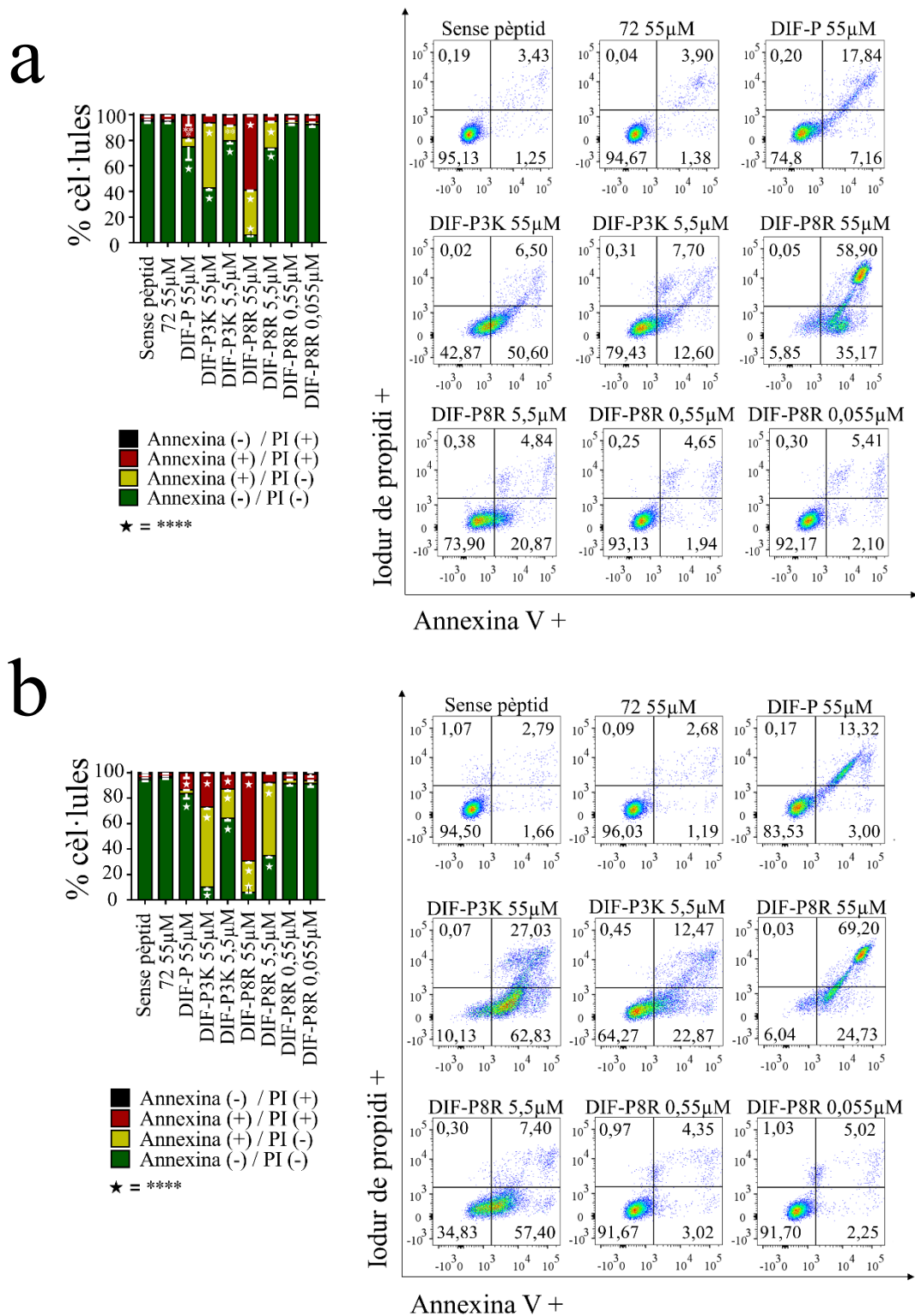


Figura 23. Resultats dels assaigs d'apoptosi de les cèl·lules NALM-6 cultivades amb diferents concentracions dels pèptids DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R durant 1 hora (a) i 24 hores (b). Un cop transcorreguts els temps d'incubació, es van tenir les cèl·lules amb Annexina V i IP per tal de poder diferenciar entre les fases de mort per apoptosi i mort cel·lular. n=3.

D'altra banda, el pèptid DIF-P8R a 55 μM era altament citotòxic per a les cèl·lules NALM-6, ja que en una sola hora era capaç de disminuir fins a un 5% el nombre de cèl·lules vives ($p=0,0001$), degut al augment tant del nombre de cèl·lules apoptòtiques (35%, $p=0,0001$) com de cèl·lules mortes (59%, $p=0,0001$). Quan disminuïem la concentració de DIF-P8R a 5,5 μM , el pèptid seguia tenint efecte citotòxic i, per tant, també es podia observar un menor nombre de cèl·lules vives respecte els controls (74%, $p=0,0001$), malgrat aquest no era tan evident. Aquesta disminució era deguda a un elevat nombre de cèl·lules apoptòtiques (21%, $p=0,0001$), però no de cèl·lules mortes (5%, $p=0,99$). A les 24 hores de cultiu, el nombre de cèl·lules vives tractades amb DIF-P8R a 55 μM era similar al que teníem a 1 hora i clarament més reduït que en els controls (6%, $p=0,0001$). En aquest cas, però, la majoria de cèl·lules estaven mortes (70%, $p=0,0001$) i el 25% es trobaven en estat apoptòtic ($p=0,0001$). Al reduir la concentració de DIF-P8R a 5,5 μM , seguïem veient que aquest tenia un efecte citotòxic, però que era clarament menor que a concentracions més elevades. A les 24 hores, DIF-P8R a 5,5 μM augmentava lleugerament, i de manera no significativa, el nombre de cèl·lules mortes (del 2,7 al 7,4%). El nombre de cèl·lules apoptòtiques, en canvi, sí que augmentava de manera evident (57%, $p=0,0001$). El patró recorda, en certa manera, al patró de mort de DIF-P3K. Per últim, quan es van incubar les cèl·lules NALM-6 a concentracions més baixes de DIF-P8R (0,5 μM i 0,05 μM), no es van observar canvis en el patró d'apoptosi respecte els controls negatius en cap dels dos temps estudiats.

2.1.1.2. Esplenòcits de ratolins *NOD.Rag2^{-/-}*

Estudis previs del laboratori havien demostrat que els pèptids DIF (DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R) són capaços d'estimular la producció de citocines proinflamatòries en esplenòcits de ratolins *NOD.Rag2^{-/-216}*. A més a més, estudis en esplenòcits de ratolins C57BL/6, NOD i *NOD.Rag2^{-/-}* van demostrar que DIF-P tenia també certa capacitat citotòxica en cultius primaris d'origen murí. Per aquesta raó, en el present estudi també vam analitzar l'efecte apoptòtic de les variants amb una cua de lisines o arginines, a diferents concentracions en esplenòcits de ratolins *NOD.Rag2^{-/-} in vitro* després de 24 hores de cultiu (figura 24).

Al tractar-se de cèl·lules de cultiu primari, els controls en si ja presentaven una elevada mortalitat. És per això que és més difícil determinar l'efecte dels pèptids en aquest tipus de cèl·lules. Tot i així, DIF-P a una concentració de 55 μM semblava induir un augment en el

percentatge de cèl·lules apoptòtiques respecte els controls negatius (sense pèptid i 72), malgrat no era estadísticament significatiu. A una concentració de 5,5 μM , l'efecte de DIF-P era encara menor. El pèptid DIF-P3K a una concentració de 55 μM provocava un augment significatiu ($p=0,0001$) en el nombre de cèl·lules mortes. Aquest passava del 35-38% en els controls negatius a un 53,5% en aquesta condició. El nombre de cèl·lules vives i apoptòtiques disminuïa lleugerament, però no de manera estadísticament significativa. DIF-P3K a 5,5 μM es comportava de manera similar a DIF-P a una concentració de 55 μM i els mínims canvis observats no eren estadísticament significatius. Per últim, el pèptid DIF-P8R a 55 μM induïa un augment del nombre de cèl·lules mortes ($p=0,0001$) que passava a ser del 59%. El nombre de cèl·lules vives, en canvi, es reduïa i passava del 30% a un 13% ($p=0,0001$). Quan disminuïem la concentració de DIF-P8R a 5,5 μM es podia observar un clar augment en el nombre de cèl·lules mortes (49%, $p=0,0008$) i una lleugera disminució en el nombre de cèl·lules apoptòtiques (16%, $p=0,041$).

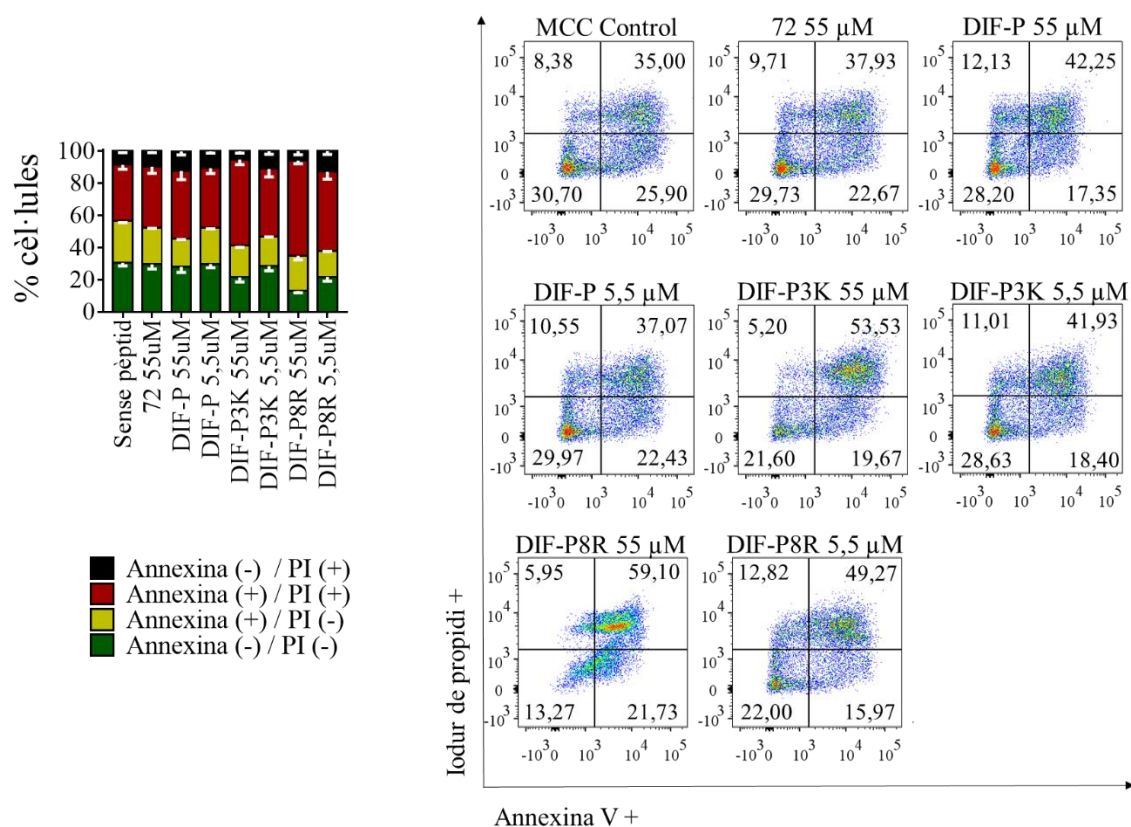


Figura 24. Resultats dels assaigs d'apoptosi en esplenòcits de ratolins NOD.Rag2^{-/-} després de 24 hores de cultiu amb diferents concentracions dels pèptids DIF-P, DIF-P3K, i DIF-P8R. Un cop transcorreguts els temps d'incubació, es van tenyir les cèl·lules amb Annexina V i IP per tal de poder diferenciar entre les fases de mort per apoptosi i mort cel·lular. n=3.

2.1.2. Estudi de l'efecte apoptòtic de la seqüència complementària de DIF-P

Tots els filaments intermedis, inclosa la periferina, presenten una estructura similar. En la seva estructura es poden diferenciar tres parts: el cap, el centre i la cua. Les principals diferències entre grups es troben en el cap i la cua, ja que són les parts variables dels FI. La part central, en forma d'hèlix α , està molt més conservada. Esta formada per 4 dominis (Coil 1A, Coil 1B, Coil 2A i Coil 2B) separats entre ells per 3 dominis d'unió (L1, L12 i L2). És per aquesta part central per on els filaments s'uneixen entre si per a formar heterodímers. De fet, els llocs d'unió principals estan situats als dominis Coil 1A i Coil 2B^{219,220}. El pèptid DIF-P forma part de la seqüència de la Coil 2B de la periferina. És per això que també es va analitzar l'efecte apoptòtic dels pèptids de la llibreria peptídica de la periferina que es troben en la regió que interacciona amb el *core* de DIF-P quan es formen els dímers de periferina. Per tal de determinar si aquesta seqüència complementària té els mateixos efectes citotòxics que DIF-P, es van realitzar cultius de la línia cel·lular NALM-6 amb els diferents pèptids (del 20 al 30) a una concentració de 55 μ M i es van analitzar els efectes d'aquests a dos temps diferents: a una i a 24 hores. En aquest cas, els pèptids utilitzats havien estat diluïts en DMSO. Les seqüències de tots aquests pèptids estan descrites en la taula 7 de *Materials i Mètodes*.

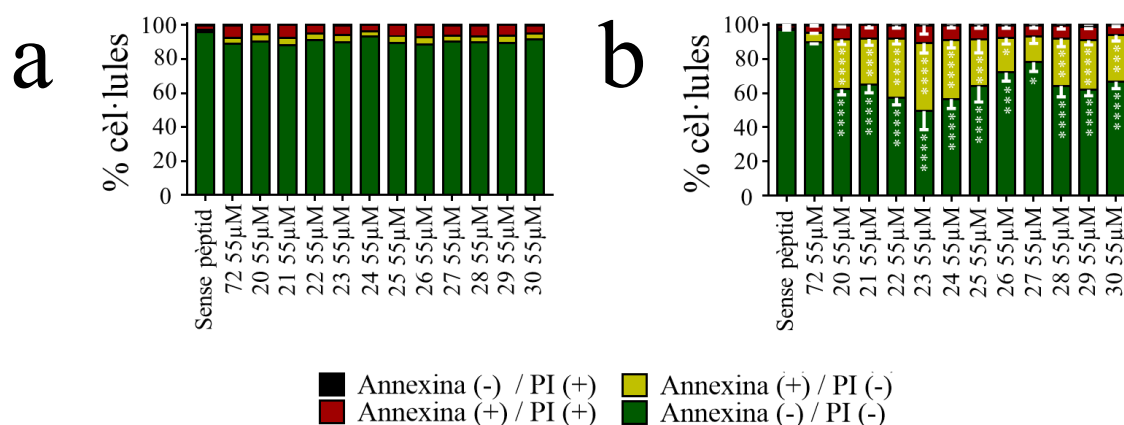


Figura 25. Resultats dels assaigs d'apoptosi de les cèl·lules NALM-6 cultivades amb els pèptids derivats de la periferina complementaris a la seqüència de DIF-P durant 1 hora (a) i 24 hores (b). Un cop transcorreguts els temps d'incubació, es van tenyir les cèl·lules amb Annexina V i IP per tal de poder diferenciar entre les fases de mort per apoptosi i mort cel·lular. n=3.

Els resultats obtinguts després d'una hora de cultiu no eren estadísticament significatius en cap dels pèptids analitzats, els quals no presentaven diferències en nombre de cèl·lules vives, apoptòtiques o mortes respecte els controls (figura 25a). A les 24 hores de cultiu, en canvi, sí que hi havia una disminució estadísticament significativa en el nombre de cèl·lules

vives en tots els pèptids que presentaven part de la seqüència complementària del pèptid DIF-P. Tal i com es mostra en la figura 25b, mentre els controls negatius (sense pèptid i pèptid 72) mantenien més d'un 90% de cèl·lules vives, la resta de pèptids analitzats induïen certa mortalitat en les cèl·lules NALM-6, quedant entre un 50% i un 80% de cèl·lules vives ($p < 0,01$).

2.1.3. Estudi de l'efecte apoptòtic d'altres filaments intermedis amb la mateixa seqüència consens

La majoria de filaments intermedis tenen una seqüència consens. Aquesta és molt similar a la del pèptid DIF-P i, malgrat hi ha petits canvis d'aminoàcids en algunes posicions, aquests sempre mantenen un patró del tipus d'aminoàcid substituït. Per tal de determinar si altres pèptids derivats d'altres filaments tenien el mateix efecte nociu que DIF-P, es va analitzar l'efecte citotòxic de diversos pèptids que contenien la seqüència consens de DIF-P però que provenien de queratines (KRT9, KRT13, KRT32, i KRT84) i de la lamin A (LMNA) quan es trobaven en cultiu amb cèl·lules NALM-6 durant una i 24 hores. També es van utilitzar dos pèptids que provenien de queratines i als que, a més a més, se'ls va afegir una cua de 8 arginines (KRT9-8R i KRT18-8R). Les seqüències de tots aquests pèptids estan descrites en la taula 7 de *Materials i Mètodes*. Tots els pèptids es van utilitzar a una concentració de 55 μ M.

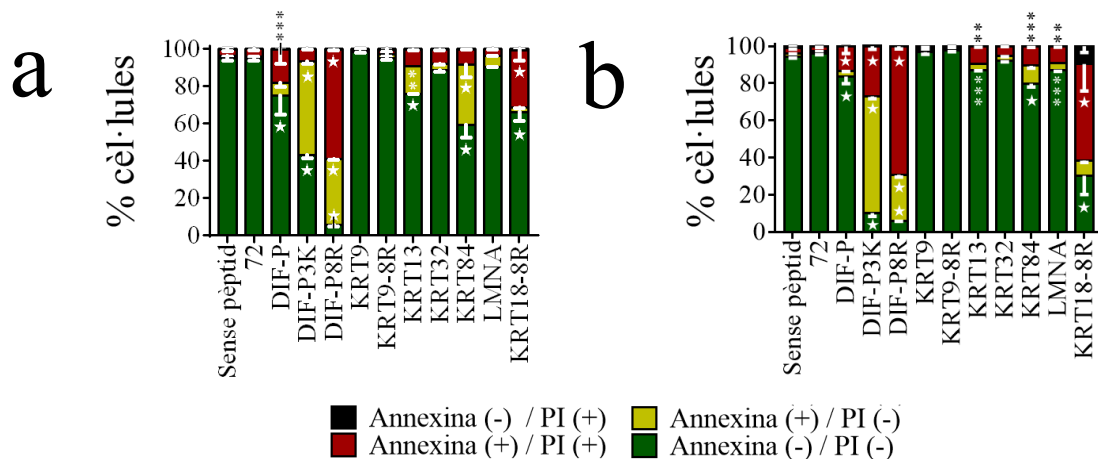


Figura 26. Resultats dels assaigs d'apoptosi de les cèl·lules NALM-6 cultivades amb pèptids derivats de diferents filaments intermedis durant 1 hora (a) i 24 hores (b). Un cop transcorreguts els temps d'incubació, es van tenyir les cèl·lules amb Annexina V i IP per tal de poder diferenciar entre les fases de mort per apoptosi i mort cel·lular. n=3.

Tal i com es mostra en la figura 26, alguns d'aquests pèptids eren capaços de disminuir la viabilitat cel·lular de la mateixa manera que ho fa DIF-P, però no tenien el mateix efecte

citotòxic que DIF-P3K o DIF-P8R, probablement degut a la manca de les cues de lisines o arginines. Amb tan sols una hora de cultiu, el nombre de cèl·lules en estat apoptòtic augmentava al 15% quan es cultivaven amb KRT13 ($p=0,007$) i al 32% quan es cultivaven amb KRT84 ($p=0,0001$). A les 24 hores, algunes d'aquestes cèl·lules apoptòtiques ja estaven mortes, tant amb KRT13 (9%, $p=0,007$) com amb KRT84 (10%, $p=0,007$), i d'altres es mantenien en estat apoptòtic, sobretot en aquest últim pèptid (10,5%, $p=0,0003$). La resta de pèptids derivats d'altres filaments, no tenien cap efecte estadísticament significatiu en la viabilitat de les cèl·lules NALM-6 després d'una hora de cultiu. A les 24 hores, en canvi, la LMNA induïa certa mortalitat cel·lular (9%, $p=0,007$). Curiosament, la KRT18-8R induïa una elevada mortalitat de les cèl·lules NALM-6 en tan sols una sola hora de cultiu (30,4%, $p=0,0001$), essent el nombre de cèl·lules mortes més elevat que en DIF-P3K (6,5%) però menys que en DIF-P8R (58,9%). Tot i així, DIF-P3K presentava un gran nombre de cèl·lules en estat apoptòtic (50,6%), a diferència de KRT18-8R (2,5%). En conjunt, això feia que el nombre de cèl·lules tractades amb KRT18-8R que seguien essent viables (66,25%) fos més elevat que el del nombre de cèl·lules tractades amb DIF-P3K (42,9%). A les 24 hores de cultiu, en comparació amb els controls sense pèptid i pèptid 72, el nombre de cèl·lules vives cultivades amb KRT18-8R es reduïa dràsticament (30,25%, $p=0,0001$). Tot i així, el seu efecte citotòxic seguia essent menor que el dels pèptids DIF-P3K i DIF-P8R, que presentaven un 10,13% i un 6,04% de cèl·lules vives, respectivament. DIF-P, en canvi, conservava un 83,5% de cèl·lules viables.

En conjunt, aquests resultats posen de manifest la importància de la cua de lisines o arginines en l'activitat citotòxica de DIF-P i altres seqüències similars.

2.1.4. Estudi de la importància de la seqüència aminoacídica de DIF-P

Un cop demostrat que les seqüències provinents d'altres filaments intermedis també tenien cert efecte apoptòtic, el següent pas va ser intentar determinar quins d'aquests aminoàcids altament conservats en la seqüència consens són essencials per a l'activitat dels fragments peptídics. Per fer-ho, es van utilitzar diferents pèptids en els quals s'havia substituït el aminoàcid que es creia essencial per una alanina, és a dir, vam realitzar un escaneig d'alanines (de l'anglès, *alanine scanning*). A més a més, també es van fer servir 2 pèptids amb la seqüència de DIF-P i als quals se'ls va afegir una sola lisina en l'extrem A-terminal (DIFc-AK) o C-terminal (DIFc-CK), així com un pèptid en que es va modificar la cua de lisines del pèptid DIF-P3K per una cua de Alanina-Tirosina-Treonina (DIFc-AYT). Per

últim, també es va utilitzar un fragment peptídic que contenia els mateixos aminoàcids que DIF-P3K però ordenats aleatòriament (*scrambled peptide*) per tal de demostrar que era la seqüència en si, i no el conjunt aleatori d'aminoàcids, el que tenia aquest efecte apoptòtic. Les seqüències de tots aquests pèptids estan descrites en la taula 7 de *Materials i Mètodes*.

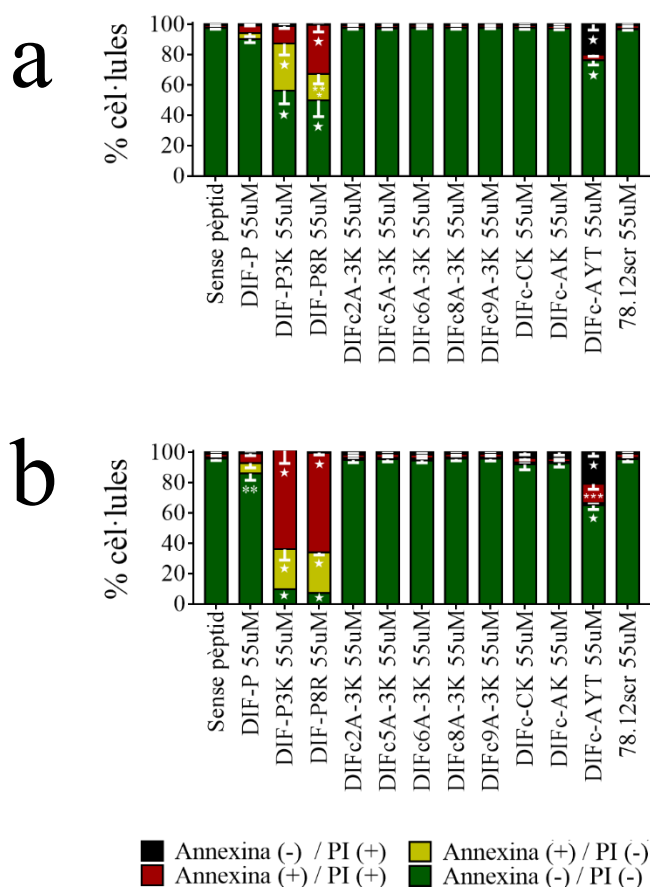


Figura 27. Resultats dels assaigs d'apoptosi de les cèl·lules NALM-6 cultivades amb els pèptids durant 1 hora (a) i 24 hores (b). Un cop transcorreguts els temps d'incubació, es van tenyir les cèl·lules amb Annexina V i IP per tal de poder diferenciar entre les fases de mort per apoptosi i mort cel·lular. n=3.

Tal i com es mostra en la figura 27, els pèptids als quals se'ls havia modificat un dels aminoàcids essencials no presentaven activitat citotòxica a cap dels 2 temps estudiats. Només el pèptid DIF-AYT promovia certa mortalitat en les cèl·lules. Durant la primera hora de cultiu, el nombre de cèl·lules vives es reduïa aproximadament un 24% en comparació amb el control amb MCC ($p=0,0001$), presentant per tant una major capacitat citotòxica que el pèptid DIF-P (90% cèl·lules vives) però menor que els pèptids DIF-P3K (56% cèl·lules vives, $p=0,0001$) i DIF-P8R (50% cèl·lules vives, $p=0,0001$). Aquestes diferències es feien molt més evidents a les 24 hores de cultiu de les cèl·lules NALM-6 amb els diferents pèptids, on el control presentava un 96% de cèl·lules vives; DIF-P, un 86% ($p=0,003$); DIF-P3K, un 10% ($p=0,0001$); DIF-P8R, un 7% ($p=0,0001$) i DIF-AYT, un 65% ($p=0,0001$). Aquests resultats ens van confirmar la importància de la seqüència

aminoacídica en l'activat del pèptid i també la importància de la presència dels residus en la regió amino i carboxi terminals per afavorir la unió a la membrana citoplasmàtica i la posterior entrada dels pèptids DIF a l'interior de la cèl·lula.

2.2. Estudis sobre el mecanisme d'acció dels pèptids derivats de la periferina

Un cop demostrat l'efecte apoptòtic de la seqüència peptídica de DIF-P, es van explorar els possibles mecanismes d'acció a través del qual actua.

2.2.1. Estudis de l'efecte dels pèptids en monòcits de medul·la òssia de ratolins C57BL/6

Estudis previs del nostre laboratori havien demostrat que els pèptids derivats de la periferina, a banda de tenir efectes citotòxics, eren capaços de promoure la secreció de citocines proinflamàtòries en monòcits de ratolins de la soca NOD²¹⁶. A més a més, es va veure que aquests efectes citotòxics eren deguts a l'activació de la caspasa-1 i la caspasa-3. De fet, es va poder observar que la via de mort cel·lular programada que activaven les diverses variants de DIF-P canviava en funció del pèptid, activant-se la caspasa-1 i la caspasa-3 quan la internalització del pèptid era menor (com en el cas de DIF-P), però només la caspasa-3 quan les concentracions citoplasmàtiques eren més elevades²¹⁶.

Per tal de confirmar que no es tracta d'un fet observable només en ratolins NOD i que per tant es tracta d'un efecte universal, en el present treball, es va voler analitzar la possible activació de les caspases-1 i 3 en monòcits de medul·la òssia de ratolins C57BL/6 quan aquests es cultivaven amb els diferents pèptids. A més a més, per a aquests estudis, les cèl·lules es van incubar amb 2 fàrmacs inductors dels diferents tipus de mort cel·lular programada estudiats (apoptosi i piroptosi) com a controls positius. El primer és la nigericina, la qual indueix l'activació de l'imflamasoma mitjançant l'activació de la caspasa-1. L'altre fàrmac és la staurosporina, la qual indueix apoptosi mitjançant l'activació de la caspasa-3.

2.2.1.1. Estudis de citotoxicitat

El primer pas va estar corroborar que els pèptids eren capaços d'induir la mort d'aquest tipus cel·lular. És per això que es va realitzar un assaig d'Annexina V i Iodur de Propí després d'haver incubat els monòcits de medul·la òssia de ratolins C57BL/6 amb els diferents estímuls durant una i 24 hores.

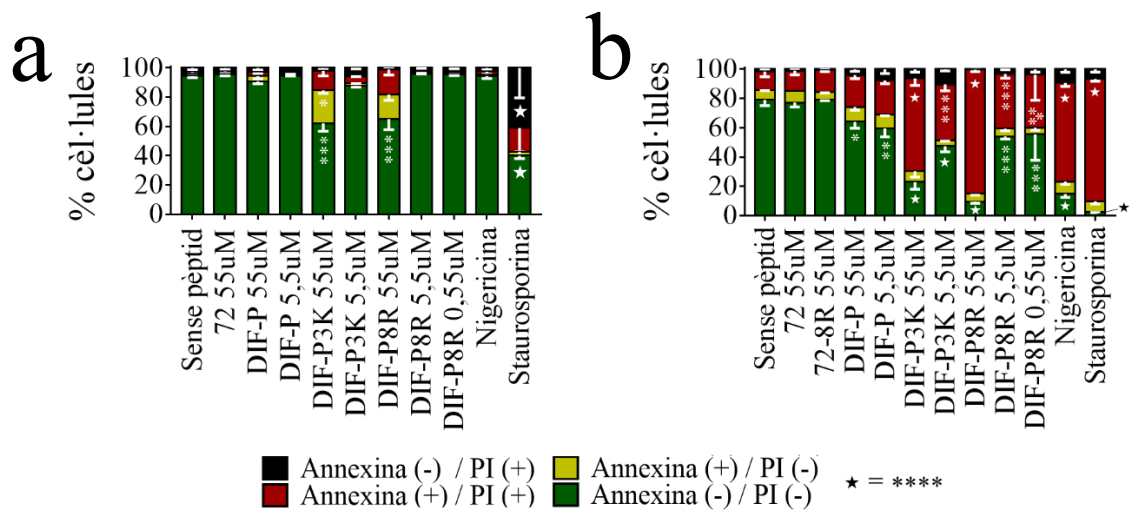


Figura 28. Resultats dels assaigs d'apoptòsi monòcits de medul·la òssia de ratolins C57BL/6 després d'una hora (a) i 24 hores (b) de cultiu amb diferents concentracions dels pèptids derivats de la periferina. Un cop transcorreguts els temps d'incubació, es van tenyir les cèl·lules amb Annexina V i IP per tal de poder diferenciar entre les fases de mort per apoptosi i mort cel·lular. n=3.

Tal i com es mostra en la figura 28, tots els pèptids analitzats, així com els controls positius de mort cel·lular, varen ser capaços d'induir, en major o menor mesura, la mort dels monòcits de medul·la òssia de ratolins C57BL/6. Malgrat no es va poder detectar cap efecte de DIF-P durant la primera hora de cultiu, el nombre de cèl·lules viues es va veure clarament reduït transcorregudes 24 hores en les dues concentracions testades: 55 μ M (64%, p=0,01) i 5,5 μ M (59,7%, p=0,007). D'altra banda, els pèptids DIF-P3K i DIF-P8R sí que presentaven activitat citotòxica durant la primera hora de cultiu en la concentració més elevada (55 μ M). A més a més, aquesta era similar en ambdós pèptids. El nombre de cèl·lules negatives tant per Annexina V com per IP en el cultiu de monòcits amb DIF-P3K era del 62,2% (p=0,0001), mentre que en el cultiu amb DIF-P8R era del 65,1% (p=0,0006). A menor concentració, cap dels dos pèptids presentava un efecte citotòxic significatiu durant la primera hora de cultiu. Transcorregudes 24 hores, els efectes nocius en la viabilitat cel·lular dels pèptids DIF-P3K i DIF-P8R a totes les concentracions testades eren clars i estadísticament significatius. Un 63,2% de les cèl·lules tractades amb DIF-P3K a 55 μ M i un 84,8% de les tractades amb DIF-P8R a 55 μ M estaven mortes al cap de 24 hores de cultiu. Aquest efecte era clarament dosi dependent, de manera que a 5,5 μ M, DIF-P3K induïa la mort del 38% de les cèl·lules. El nombre de monòcits positius per Annexina V i IP quan eren tractats amb DIF-P8R a 5,5 μ M i 0,55 μ M era del 37,2% i el 36,1%, respectivament. Curiosament, el control positiu de nigericina tampoc induïa mort cel·lular al cap d'una hora de cultiu amb les cèl·lules (igual que el pèptid DIF-P), presentant al voltant d'un 94% de cèl·lules negatives tant per IP com per annexina V. El seu efecte en la

viabilitat cel·lular, però, sí que era evident a les 24 hores de cultiu. Transcorregut aquest temps, només un 14,8% de les cèl·lules seguien vives ($p=0,0001$) i la gran majoria, un 67,4%, eren cèl·lules mortes ($p=0,0001$). La staurosporina, en canvi, sí que va induir la necrosi de les cèl·lules amb només una hora d'incubació (41%, $p=0,01$) i, passades 24 hores, el nombre de cèl·lules vives en el cultiu va ser pràcticament inexistent (2,5%, $p=0,0001$).

2.2.1.2. Estudis d'activació de caspases

Un cop demostrat que DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R eren capaços d'induir la mort dels monòcits de medul·la òssia de ratolins C57BL/6, el següent pas va ser intentar determinar quina era la via que a través de la qual activaven l'apoptosi i la mort cel·lular. Per fer-ho, es va analitzar l'activació de caspasa-3 (caspasa en la qual convergeixen les vies d'apoptosi extrínseca i intrínseca) i caspasa-1 (indispensable per a la mort per piroptosi mitjançant l'activació de l'inflamàsoma). Les cèl·lules es van incubar amb els diferents estímuls (pèptids o controls) durant una i 24 hores i, posteriorment, es van tenyir amb FLICA per tal d'estudiar l'activació de les caspases esmentades.

Tal i com es mostra en la figura 29a, i en relació amb els resultats dels estudis de citotoxicitat, la nigericina va necessitar més d'una hora per tal de promoure l'activació de la caspasa-1. En canvi, els pèptids DIF-P3K i DIF-P8R a una concentració de 55 μM eren capaços d'activar-la de manera significativa, augmentant el percentatge d'activació de caspasa-1 fins a un 57% ($p=0,0001$) i un 35,4% ($p=0,003$), respectivament. Al diluir la concentració d'aquests pèptids, l'activació de caspasa-1 va deixar de ser significativa, essent del 25,2% en els monòcits tractats amb DIF-P3K a 5,5 μM i inferior al 5% en els tractats amb DIF-P8R 5,5 μM i 0,55 μM . Malgrat l'activació de caspasa-1 en els monòcits tractats amb DIF-P a 55 μM era d'un 20,2%, això no suposava un augment estadísticament significatiu respecte al control sense pèptid. A més a més, a concentracions més baixes d'aquest pèptid (5,5 μM) l'activació de la caspasa-1 va ser molt similar a la dels controls negatius. Amb el pas de les hores, els efectes dels pèptids en l'activació de la caspasa-1 van esdevenir molt més evidents (figura 29b). Així, a les 24h amb nigericina es va observar un augment significatiu de l'activació de caspasa-1 (68%, $p=0,003$), mentre que amb DIF-P3K i DIF-P8R a 55 μM , l'activació de caspasa-1 va ser significativament major, essent d'un 83,3% ($p=0,0003$) i un 87,3% ($p=0,0002$), respectivament. De la mateixa manera, a una hora de cultiu, al diluir la concentració d'aquests pèptids, l'activació de caspasa-1 va ser

més baixa i no estadísticament significativa respecte el control sense pèptid i el pèptid 72. Tampoc va ser significativa l'activació de la caspasa-1 en presència del pèptid DIF-P en cap de les concentracions testades.

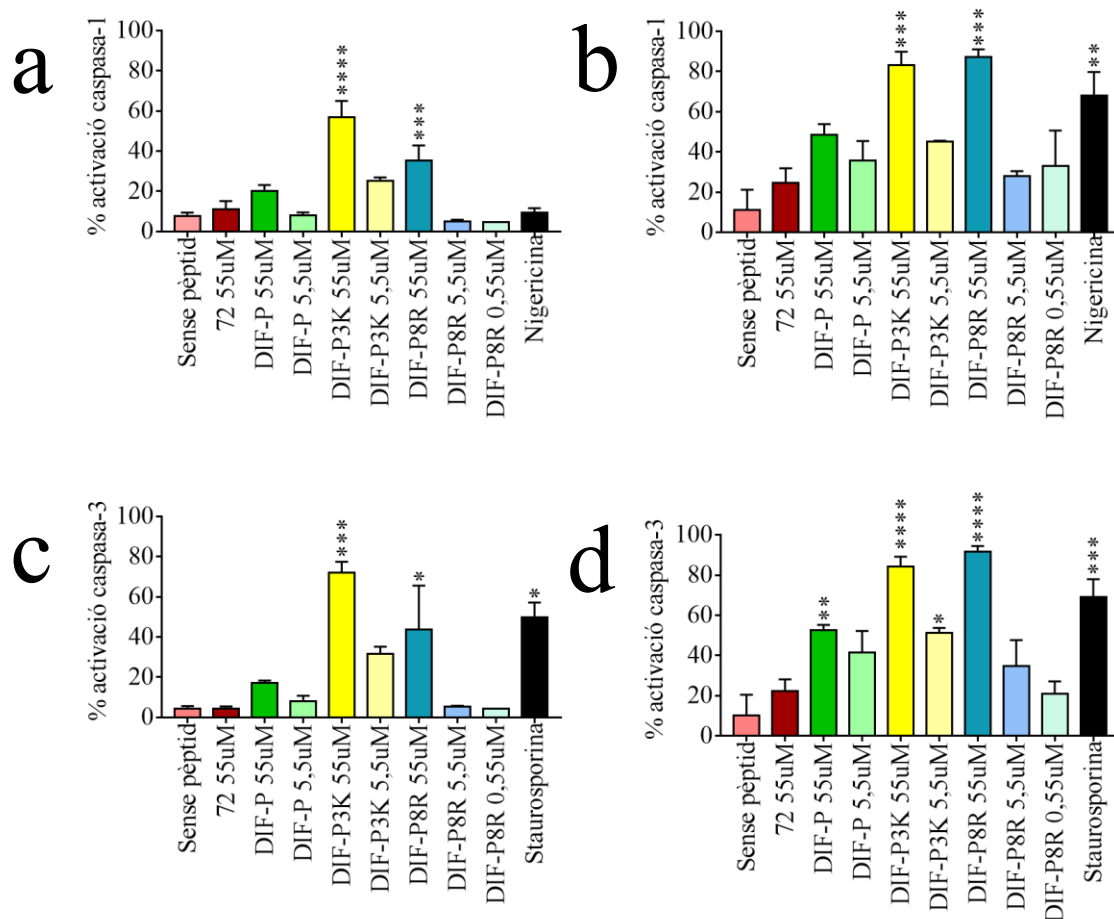


Figura 29. Nivell d'activació de la caspasa-1 i la caspasa-3 en monòcits de medul·la òssia de ratolins C57BL/6 en resposta al cultiu amb els diferents pèptids derivats de la periferina. n=3. a) Nivell d'activació de la caspasa-1 després d'una hora d'incubació amb els pèptids. b) Nivell d'activació de la caspasa-1 després de 24 hores d'incubació amb els pèptids. c) Nivell d'activació de la caspasa-3 després d'una hora d'incubació amb els pèptids. d) Nivell d'activació de la caspasa-3 després de 24 hores d'incubació amb els pèptids.

Simultàniament a l'activació de la caspasa-1, es va analitzar l'activitat de la caspasa-3 dels monòcits després d'una hora (figura 29c) i de 24 hores (figura 29d) de cultiu amb els diferents estímuls. En aquest cas, el control positiu (staurosporina) sí que va presentar un augment en el percentatge d'activació de la caspasa-3 respecte els controls negatius amb tan sols una hora d'incubació. Així, els nivells d'activació de la caspasa-3 amb la staurosporina van ser gairebé el 50% mentre que en els controls negatius varen ser tan sols del 5% ($p=0,02$). L'activació de la caspasa-3 observada en els monòcits amb la

staurosporina encara va ser més elevada (70%) després de 24 hores de cultiu ($p=0,0003$). En canvi pel que fa als pèptids DIF-P3K i DIF-P8R, a la concentració de 55 μM , l'activació de caspasa-3 va ser del 72% ($p=0,0005$) i un 43,7% ($p=0,04$), respectivament. Transcorregudes 24 hores, l'activació de la caspasa-3 encara va ser molt més elevada: a la concentració de 55 μM de DIF-P3K i de DIF-P8R es va observar una activació del 84,3% ($p=0,0001$) i del 91,7% ($p=0,0001$), respectivament. Malgrat que l'efecte de DIF-P3K a 5,5 μM no va ser clar a una hora d'incubació, sí que ho va ser a les 24 hores amb una activació de la caspasa-3 del 51,3% ($p=0,01$). En canvi, les concentracions més baixes (5,5 μM) de DIF-P8R, no van mostrar una activació estadísticament significativa de la caspasa-3 en cap dels 2 temps analitzats. Per últim, malgrat DIF-P semblava induir un lleuger augment en l'activació de la caspasa-3 (17,3%) després d'una hora de cultiu, aquest no va resultar ser estadísticament significatiu, però sí que ho va ser passades 24 hores: així un 52,7% dels monòcits incubats amb DIF-P a 55 μM van mostrar activació de la caspasa-3 ($p=0,005$).

2.2.2. Cèl·lules MEFs WT i MEFs BAX^{-/-}BAK^{-/-}

Per tal d'estudiar si l'activació de la caspasa-3 promoguda pels pèptids és deguda a l'activació de la via intrínseca de l'apoptosi, es van realitzar estudis de citotoxicitat en una línia cel·lular de fibroblasts embrionaris murins (MEF, de l'anglès *Mouse Embryonic Fibroblast*) doble *knock out* (DKO) per els gens BAX i BAK, dues proteïnes necessàries en la via intrínseca de l'apoptosi. També es va utilitzar una línia de MEFs *wild-type* (WT) com a control. Ambdues línies es van cultivar durant una i 24 hores amb els diferents pèptids DIF (DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R) així com sense cap mena d'estímul i amb els pèptids control 72 i 72-8R. Tots els pèptids es van afegir al cultiu a una concentració de 55 μM .

Tal i com es mostra en les figures 30 i 31, tant els MEFs WT com els DKO responien de manera similar a la presència dels diferents pèptids en el cultiu. No es va poder observar una inducció de l'apoptosi en presència de DIF-P en cap de les dues línies cel·lulars ni en una hora ni a les 24h de cultiu. El pèptid DIF-P3K va provocar un lleuger descens del nombre de cèl·lules vives en ambdues línies després d'una hora d'incubació, malgrat aquest no era estadísticament significatiu. A les 24 hores d'incubació, però, aquest efecte citotòxic és feia més patent, sobretot en el cas dels MEFs DKO. En aquest cas, el nombre de cèl·lules mortes era del 33,9% i el de cèl·lules necròtiques era del 22,3%. En conjunt, això feia que el nombre de cèl·lules vives es reduís fins al 37,8% ($p=0,007$), en comparació amb els

controls que presentaven al voltant d'un 80% de cèl·lules vives. En el cas dels MEFs WT tractats amb DIF-P3K, el nombre de cèl·lules vives era del 33%, aproximadament un 10% menys que en els controls. Finalment, el pèptid DIF-P8R induïa una clara mortalitat en ambdues línies cel·lulars. Amb només una hora de cultiu amb el pèptid, el nombre de cèl·lules vives es reduïa al 52,6% en MEFs WT ($p=0,004$) i al 30,4% en MEFs DKO ($p=0,0002$). Aquesta reducció era deguda, principalment, a un augment en el nombre de cèl·lules mortes. A les 24 hores de cultiu, aquesta reducció de la viabilitat cel·lular era molt més clara en les dues línies de fibroblasts, però en aquest cas no era només deguda a un augment en el nombre de cèl·lules mortes sinó també a un elevat nombre de cèl·lules necròtiques.

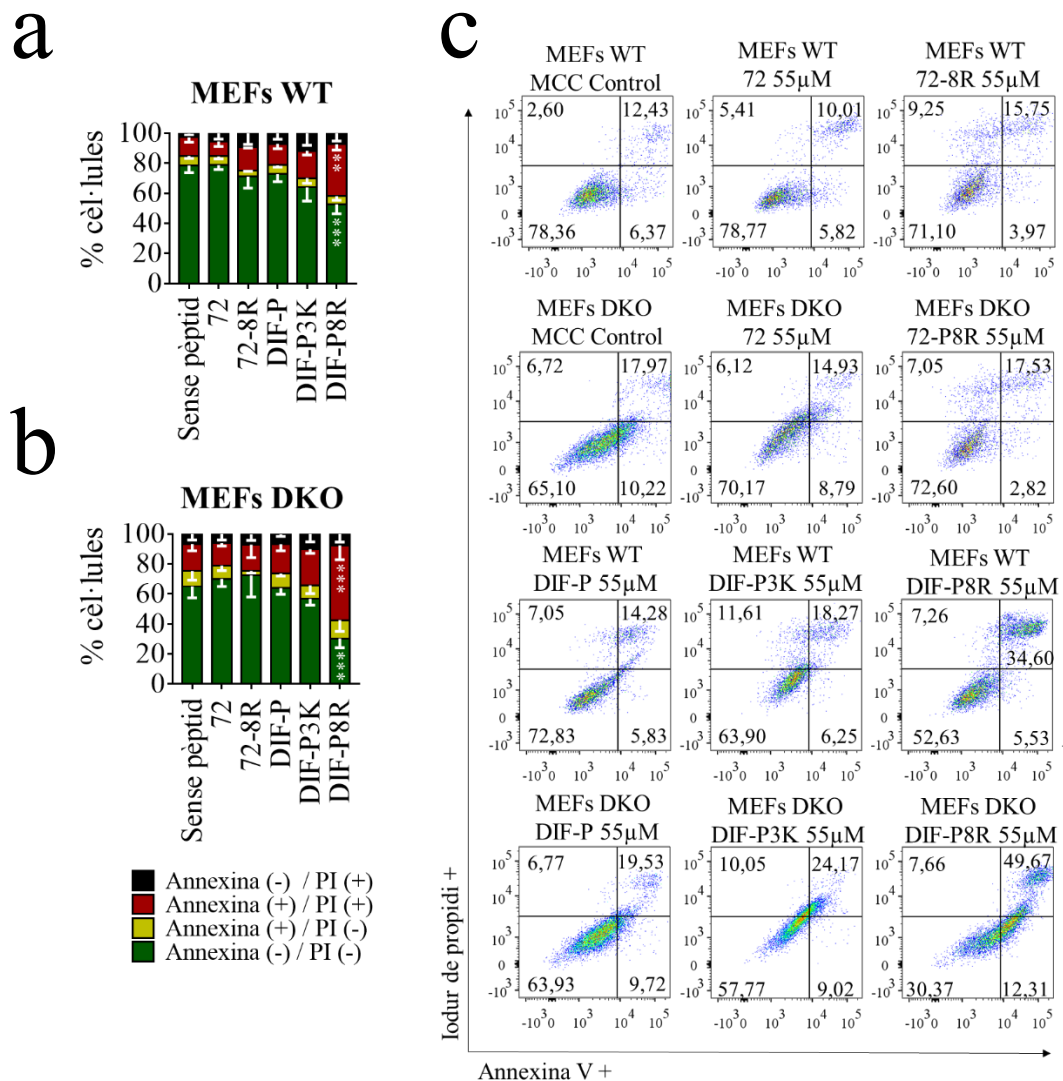


Figura 30. Resultats dels assaigs d'apoptosi amb MEFs WT (a i c) i DKO (b i c) en cultiu durant 1 hora amb els pèptids DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R. Un cop transcorreguts els temps d'incubació, es van tenir les cèl·lules amb Annexina V i IP per tal de poder diferenciar entre les fases de mort per apoptosi i mort cel·lular. n=3.

De manera general, no es van observar diferències estadísticament significatives entre els MEFs WT i els MEFs DKO en cap de les condicions, la qual cosa suggeria que la via per la qual els pèptids induïen apoptosi era la mateixa en ambdues línies i que, per tant, aquesta era independent de BAX i BAFF.

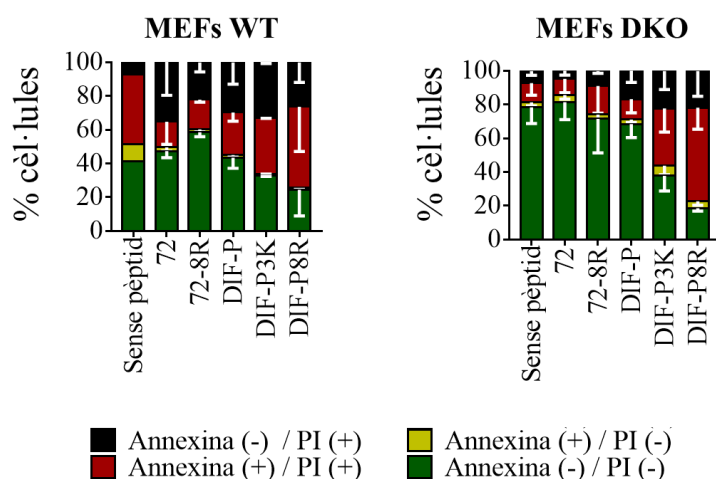


Figura 31. Resum dels resultats dels assaigs d'apoptosi amb MEFs WT i DKO en cultiu durant 24 hores amb els pèptids DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R. Un cop transcorreguts els temps d'incubació, es van tenyir les cèl·lules amb Annexina V i IP per tal de poder diferenciar entre les fases de mort per apoptosi i mort cel·lular. n=3.

2.2.3. *Estudis histològics per localitzar el lloc d'acció dels pèptids*

2.2.3.1. *Estudis de criomicroscòpia electrònica*

A continuació, per tal de poder determinar com i on actuen els pèptids derivats de la periferina, es van realitzar estudis de criomicroscòpia electrònica. Tal i com s'ha esmentat anteriorment, aquests eren capaços d'induir la mort de diversos tipus cel·lulars, entre ells dels esplenòcits de ratolins NOD.Rag2^{-/-}. A més a més, estudis previs del nostre laboratori, havien demostrat que els pèptids eren capaços d'estimular la producció de citocines proinflamàtores en aquest tipus cel·lular. És per això que per als estudis de criomicroscòpia electrònica es van utilitzar limfòcits provinents de la melsa de ratolins NOD.Rag2^{-/-}, els quals es van incubar durant 15 minuts amb els pèptids 72 (control negatiu), DIF-P o DIF-P8R marcats amb biotina i, posteriorment, es van fixar i es van analitzar a la Unitat de Criomicroscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

Tal i com es mostra en les imatges de la figura 32, i en concordança amb els estudis de citotoxicitat, el pèptid 72 no presentava cap mena d'efecte en la viabilitat de les cèl·lules, les quals presentaven una morfologia completament normal. A més a més, en aquest cas no es va observar la internalització del pèptid en els limfòcits. De manera completament oposada, el pèptid DIF-P8R, amb tan sols 15 minuts d'incubació, era capaç de destruir per complet la morfologia d'algunes de les cèl·lules i provocar-ne la seva mort. Tot i així, cal

destacar que DIF-P8R no tenia el mateix efecte en totes les cèl·lules i que, en alguns casos, aquestes mantenien la seva morfologia. En aquestes, però, es va poder observar que el pèptid DIF-P8R era capaç d'entrar a l'interior cel·lular i que, en ocasions, es localitzava en el nucli de la cèl·lula, suggerint un possible paper en l'activació de gens de mort cel·lular. A més a més, en les aquelles cèl·lules a les que DIF-P8R havia induït una completa destrucció, es podia intuir també que el pèptid podria localitzar-se en el nucli cel·lular i unir-se a algun component d'aquest. Per últim, malgrat el pèptid DIF-P no induïa la mort dels limfòcits, es va poder observar que era capaç d'entrar a la cèl·lula i, de la mateixa manera que DIF-P8R, en alguns casos es localitzava a l'interior del nucli cel·lular.

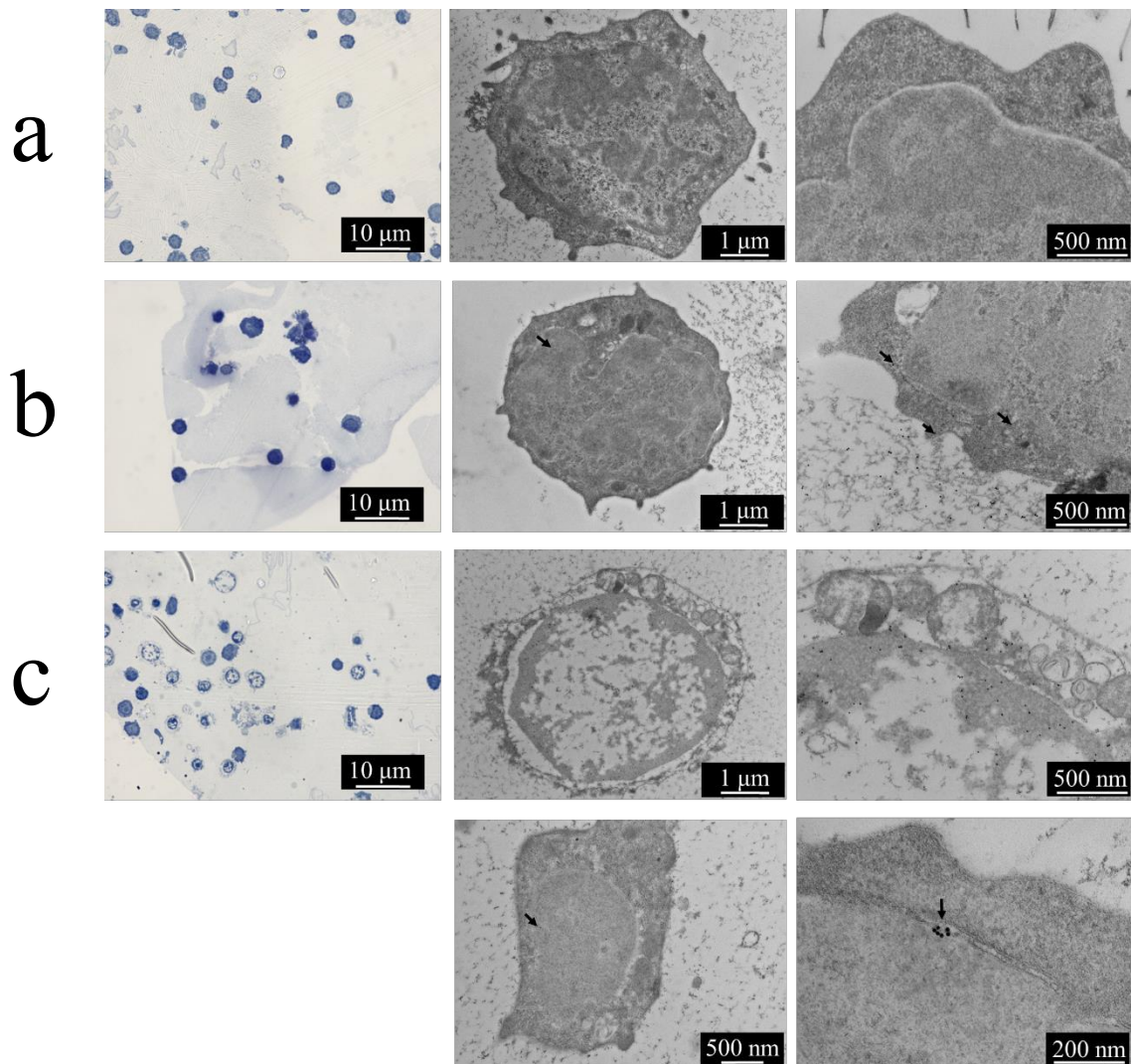


Figura 32. Visualització del mecanisme d'entrada dels pèptids per imatges de criomicroscòpia electrònica . Els esplenòcits de melsa de ratolí NOD.Rag2^{-/-} es van tractar durant 15 minuts amb els pèptids 72 (a), DIF-P (b) i DIF-P8R (c) marcats amb biotina.

2.2.3.2. Tincions de fluorescència de les cèl·lules Hep-2

Per tal d'estudiar millor el patró d'internalització dels pèptids derivats de la periferina, es van realitzar tincions d'immunofluorescència en cèl·lules HEP-2. Aquestes cèl·lules han estat utilitzades de manera habitual a nivell clínic en l'estudi de la presència d'autoanticossos en el sèrum de pacients amb diverses malalties autoimmunitàries. L'ús de les cèl·lules HEP-2 és molt útil per a la detecció d'anticossos antinuclears (ANA), però també en la detecció d'autoanticossos contra autoantígens presents en diferents compartiments citoplasmàtics. La seva importància en el diagnòstic de certes malalties ha permès generar un conjunt de patrons de tinció establerts i que, en el nostre cas, podrien ajudar a entendre on es localitzen els pèptids per a fer la seva funció.

Per tal de corroborar els resultats obtinguts en la criomicroscòpia electrònica, en el present estudi es van tractar les cèl·lules HEP-2 amb els pèptids 72, 72-8R, DIF-P i DIF-P8R marcats amb biotina per a, posteriorment, fer una tinció amb estreptavidina marcada amb eFluor570. D'aquesta manera, vam poder determinar, gràcies als patrons preestablerts de les proves d'ANA, el patró d'internalització dels nostres pèptids. Tal i com es mostra en la figura 33, tant el pèptid DIF-P8R com el pèptid 72-8R semblaven localitzar-se al nucli, malgrat el patró amb el que ho feien era diferent: 72-8R tenia un patró de fluorescència que fa pensar en el un patró nucleolar (AC-10), mentre que DIF-P8R recordava a un patró de membrana nuclear llisa (AC-11) i/o un patró nuclear granular fi (AC-2 o AC-4). DIF-P, en canvi, malgrat semblava que s'havia unit en molt menor mesura a la cèl·lula, es localitzava al citoplasma al voltant del nucli i recordava a un patró citoplasmàtic reticular (AC-20 o AC-21). Els controls sense pèptid i amb el pèptid 72 no mostraven cap patró de tinció.

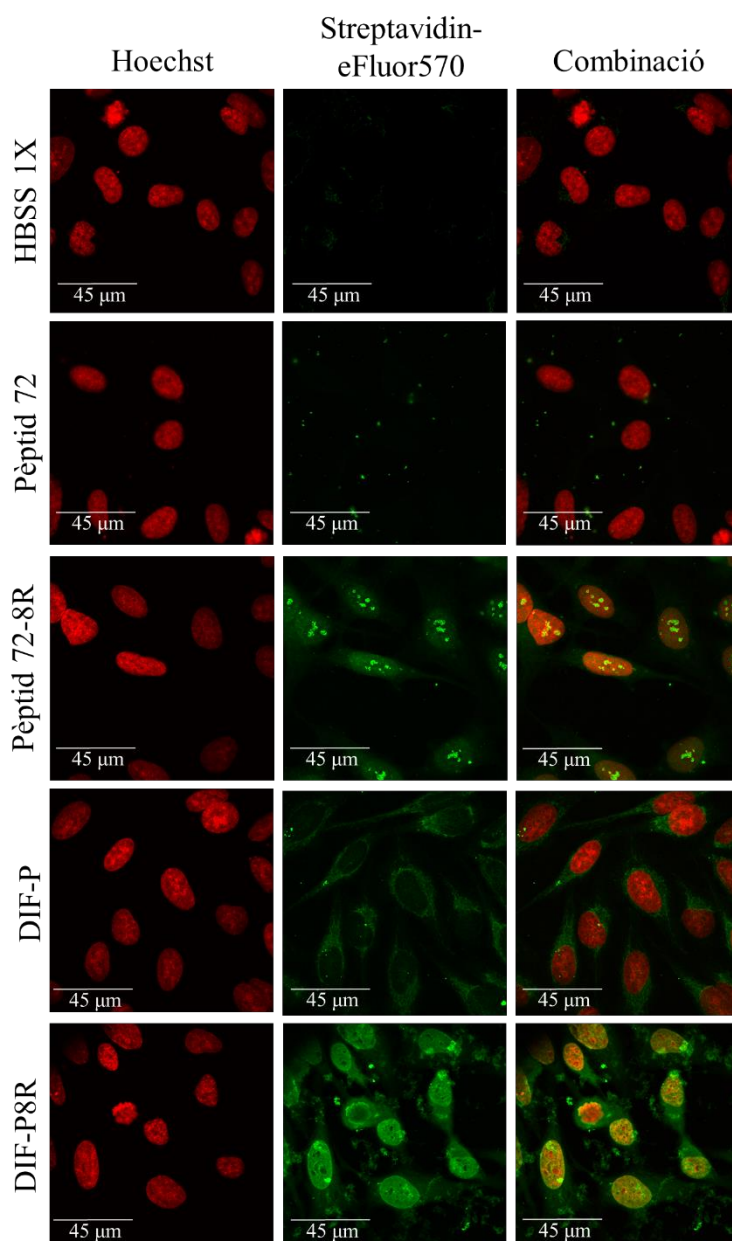


Figura 33. Imatges de fluorescència obtingudes amb la incubació dels pèptids sobre cèl·lules HEp-2. Les cèl·lules Hep-2, prefixades en el portaobjectes, es van tractar durant una hora amb els pèptids 72, 72-8R, DIF-P i DIF-P8R marcats amb biotina. Seguidament es va fer una tinció amb hoechst i estreptavidina marcada amb eFluor570 i es va observar al microscopi FV100.

2.2.3.3. Tincions de fluorescència de *C. luciliae*

Les tincions de fluorescència de *C. luciliae* han estat utilitzades de manera habitual a nivell clínic en l'estudi de la presència d'autoanticossos contra ADN de doble cadena. Es tracta d'un organisme unicel·lular que té tant el nucli com una massa comprimida d'ADN de doble cadena, anomenada quinetoplast. Només quan els anticossos reconeixen el quinetoplast de *C. luciliae*, es considera que reaccionen contra el ADN de doble cadena, ja que en el nucli podria haver reactivitat contra altres components. Com que els estudis d'histologia semblaven indicar que els pèptids s'unien a algun element nuclear, es va decidir tractar uns portaobjectes de *C. luciliae* amb els pèptids 72, 72-8R, DIF-P i DIF-P8R

marcats amb biotina. A continuació es va realitzar una tinció amb estreptavidina marcada amb eFluor570.

Tal i com es mostra en la figura 34, el pèptid DIF-P8R sembla localitzar-se en el quinetoplast, suggerint que aquest podria estar unint-se a ADN de doble cadena. El pèptid 72-8R, en canvi, sembla que envolta aquesta massa d'ADN però no s'hi uneix. La resta de condicions (HBSS 1X, pèptid 72 i DIF-P) presenten certa tinció citoplasmàtica, probablement *background*, però no es localitzen ni al nucli ni al quinetoplast de *C. luciliae*.

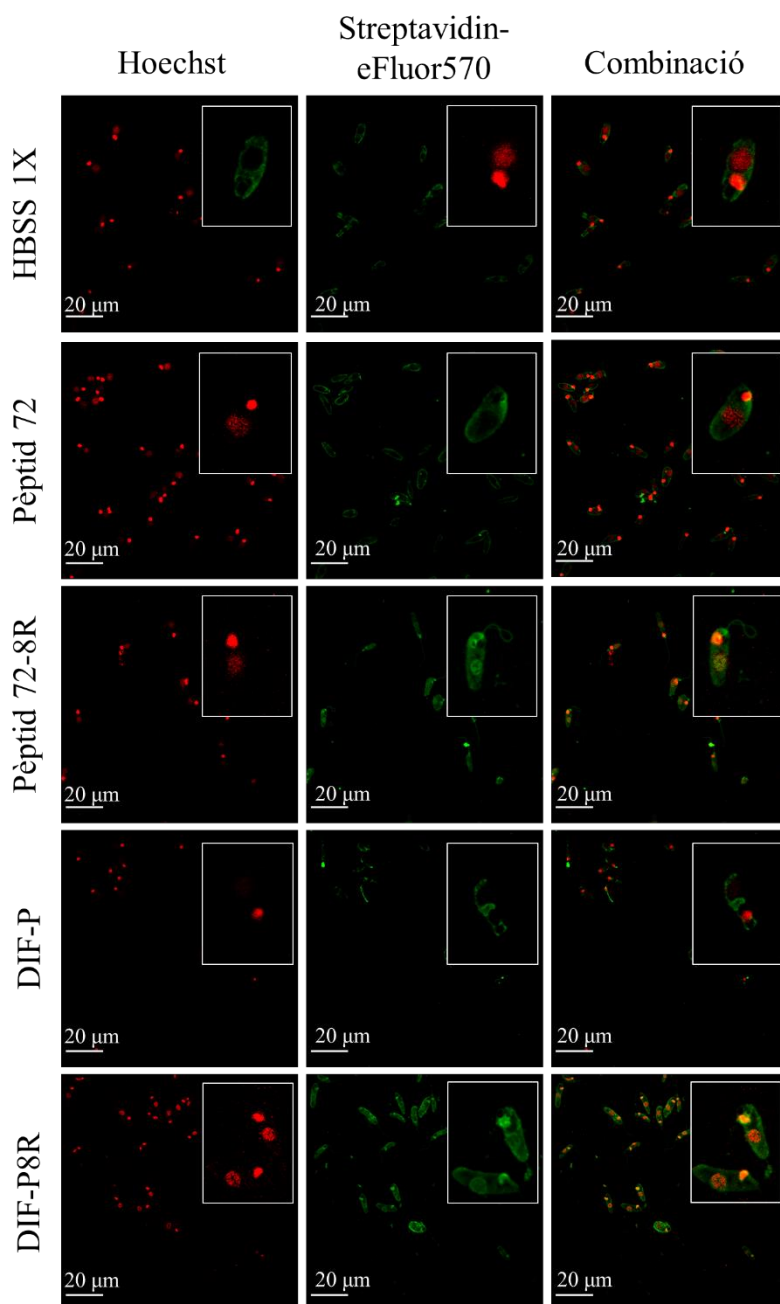


Figura 34. Imatges de fluorescència obtingudes amb la incubació dels pèptids sobre *C. luciliae*. Les cèl·lules de *C. luciliae*, prefixades en el portaobjectes, es van tractar durant una hora amb els pèptids 72, 72-8R, DIF-P i DIF-P8R marcats amb biotina. Seguidament es va fer una tinció amb hoechst i estreptavidina marcada amb eFluor570 i es va observar al microscopi FV100.

2.2.4. Anàlisi del receptor de DIF-P i DIF-P8R

El següent pas va tenir com a objectiu determinar a quina molècula s'unien els diferents pèptids. Com que els estudis d'histologia semblaven indicar que els pèptids s'unien, en major o menor mesura, a algun element nuclear, es va realitzar la precipitació amb extractes proteics d'aquest compartiment cel·lular. Aquest assaig consistia en incubar els extractes proteics del nucli de cèl·lules NALM-6 durant una hora a temperatura ambient en 5 condicions diferents: sense pèptid, pèptid 72-Biotina, pèptid 72-8R-Biotina, DIF-P-Biotina i, per últim, DIF-P8R-Biotina. Posteriorment, es va fer una precipitació amb *beads* magnètiques recobertes amb estreptavidina, de manera que a aquestes s'hi unissin els pèptids marcats amb biotina juntament amb aquelles proteïnes amb afinitat amb aquests. Les bandes observades en la condició control, és a dir, en la que l'extracte no s'havia incubat amb cap dels pèptids, es van considerar unions inespecífiques i es van descartar. Les diferents bandes d'interès (senyalades a la figura 35) es van aïllar per al seu futur anàlisi per espectrometria de masses. Tots els pèptids identificats a partir de les bandes seleccionades es recullen en l'annex.

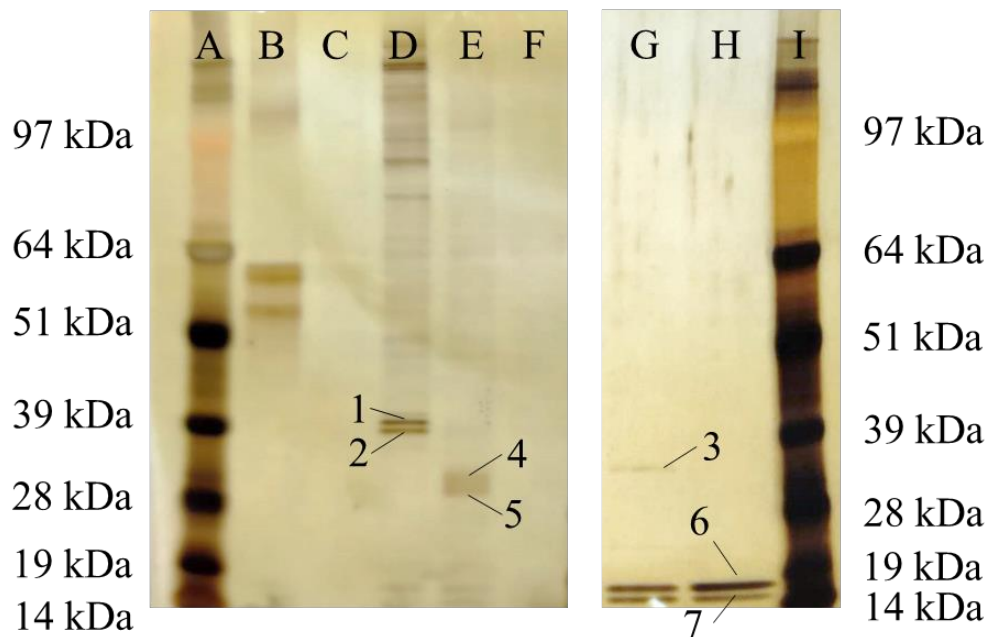


Figura 35. Immunoprecipitació de la fracció proteica nuclear de cèl·lules NALM-6 amb els diferents pèptids. A) Marcador de pes molecular. B) Sense pèptid. C) Pèptid 72-Biotina. D) Pèptid 72-8R-Biotina. E) Pèptid DIF-P-Biotina. F) Pèptid DIF-P8R-Biotina. G) Pèptid DIF-P-Biotina concentrat. H) Pèptid DIF-P8R-Biotina concentrat. I) Marcador de pes molecular.

Malgrat les imatges de fluorescència suggerien que DIF-P8R tenia una diana nuclear, la precipitació de l'extracte proteic amb aquest pèptid no mostrava cap banda de manera clara (figura 35, F). Sí que s'intuïa, però, una ombra als 14-19 kDa. Al concentrar l'extracte proteic, es van poder observar clarament dues bandes (6 i 7) en aquest pes molecular (figura 35, H), les quals també es van poder intuir en la precipitació de l'extracte nuclear no concentrat amb DIF-P (figura 35, E). A més a més, la precipitació d'aquestes bandes amb DIF-P es va confirmar al concentrar l'extracte (figura 35, G). Els resultats de l'espectrometria de masses suggereixen que les bandes 6 i 7, precipitades amb DIF-P8R, podrien correspondre a diferents histones (H2A i H2B). Malgrat no es van analitzar per espectrometria, unes bandes del mateix pes molecular també havien precipitat amb el pèptid DIF-P, indicant que ambdós pèptids podrien tenir una mateixa diana nuclear.

D'altra banda, es va observar la precipitació de dues bandes tènues d'uns 30 kDa en l'extracte amb DIF-P (bandes 4 i 5). Sorprenentment, en l'extracte concentrat es va observar només una banda d'aquest pes molecular (banda 3), probablement degut a una pèrdua de proteïna en el procés de concentració, o bé al canvi d'afinitat del pèptid per la proteïna amb el canvi de tampó. Els resultats de l'espectrometria de masses suggereixen que les bandes 3, 4 i 5, precipitades amb DIF-P, podrien ser la proteïna hnRNPA2B1 (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2/B1*).

Per últim, també es van observar dues bandes d'uns 40 kDa en l'extracte proteic amb el pèptid 72-8R, les quals podrien correspondre a diferents estats de la proteïna SIRT7 (*NAD-dependent Protein deacetylase sirtuin-7*).

2.3. Estudis dels efectes in vivo dels pèptids derivats de la periferina

2.3.1. Comprovació dels efectes in vitro dels pèptids en línies cel·lulars tumorals de ratolí

Donades les propietats citotòxiques dels pèptids DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R observades en els estudis *in vitro*, el següent pas va ser demostrar que aquests també són capaços d'induir la mort de cèl·lules tumorals murines per a, posteriorment, fer un salt als estudis *in vivo*. Es van realitzar cultius de les línies cel·lulars P815 (derivada d'un mastocitoma d'un ratolí DBA/2N) i B16-F10 (derivada d'un melanoma d'un ratolí C57BL/6) amb els diferents pèptids i es va analitzar el efecte apoptòtic de diverses concentracions d'aquests a dos temps diferents (una i 24 hores).

2.3.1.1. Inducció d'apoptòsi en cèl·lules de melanoma murí: cèl·lules B16-F10

En la figura 36 es poden observar les diferències entre les cèl·lules B16-F10 incubades a diferents concentracions de DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R, així com amb els controls negatius, el pèptid 72 i sense cap mena d'estímul, tant a una hora com a 24 hores de cultiu.

El pèptid DIF-P a una concentració de 55 μM induïa un lleuger augment en el percentatge de cèl·lules mortes respecte els controls negatius (sense pèptid i pèptid 72). Només amb 1 hora de cultiu el percentatge de cèl·lules mortes augmentava fins a un 34% ($p=0,001$), tot i que el percentatge de cèl·lules apoptòtiques es mantenia al voltant del 15%. A les 24 hores de cultiu, els controls negatius tenien aproximadament un 30% de cèl·lules mortes, mentre que les que havien estat incubades amb DIF-P a 55 μM presentaven un 52% de cèl·lules mortes ($p=0,004$). De la mateixa manera que en els cultius d'una hora, l'augment en el nombre de cèl·lules apoptòtiques no era estadísticament significatiu. D'altra banda, quan es va disminuir la concentració del pèptid a 5,5 μM , no es van observar diferències significatives en els percentatges de cèl·lules mortes en comparació amb els controls negatius en cap dels dos temps de cultiu.

El pèptid DIF-P3K a una concentració de 55 μM va provocar un augment en els percentatges tant de cèl·lules mortes com de cèl·lules apoptòtiques respecte els controls negatius. En la primera hora de cultiu, el nombre de cèl·lules mortes en els controls era d'entre el 10 i el 15%, mentre que el pèptid DIF-P3K induïa un 27,63% de mortalitat ($p=0,04$). Aquest augment era molt més evident passades 24 hores, presentant un 58% de nombre de cèl·lules mortes ($p=0,0001$). Durant la primera hora de cultiu, també es va observar un augment en el nombre de cèl·lules apoptòtiques, el qual passava del 10-16% en els controls al 32,47% en aquesta condició ($p=0,003$). En canvi, a les 24 hores de cultiu el nombre de cèl·lules apoptòtiques es mantenia a un percentatge similar al dels controls. Pel que fa al cultiu de DIF-P3K a una concentració de 5,5 μM , es va observar un patró similar al de les cèl·lules cultivades en condicions control.

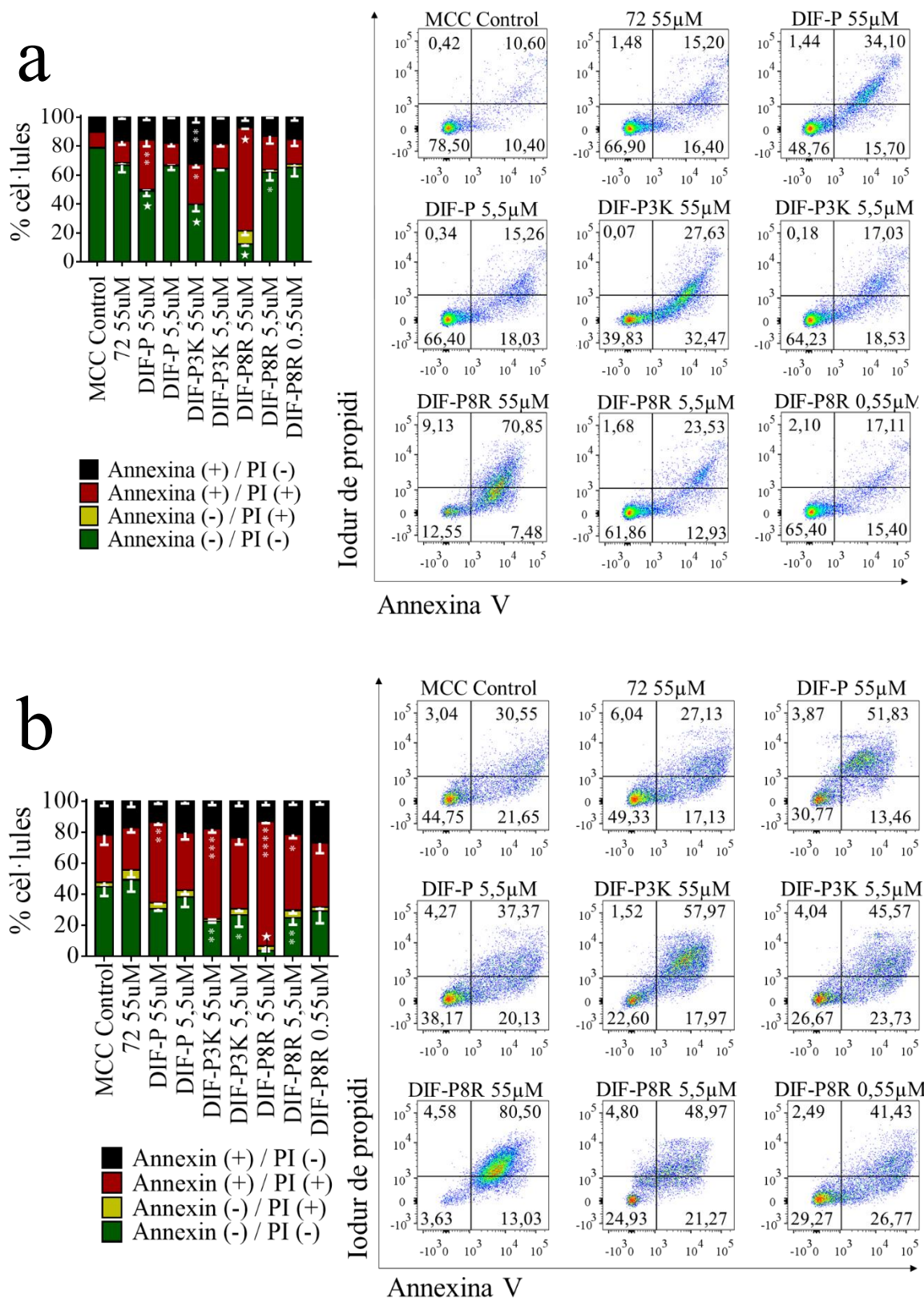


Figura 36. Resultats dels assaigs d'apoptosi amb cèl·lules de melanoma murí B16-F10 en cultiu durant 1 hora (a) i 24 hores (b) amb els pèptids DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R a diferents concentracions. Un cop transcorreguts els temps d'incubació, es van tenir les cèl·lules amb Annexina V i IP per tal de poder diferenciar entre les fases de mort per apoptosi i mort cel·lular. n=3.

Finalment, el pèptid DIF-P8R a 55 μM provocava un augment estadísticament significatiu del nombre de cèl·lules mortes (70%, $p=0,0001$) en tan sols 1 hora de cultiu. A les 24 hores de cultiu, només un 3,63% de les cèl·lules seguien vives ($p=0,0001$). La majoria, un 80,5%, eren positives tant per annexina com per IP i el 13% eren només positives per annexina ($p=0,0001$). Al disminuir la concentració de DIF-P8R a 5,5 μM i 0,55 μM , no es van observar canvis estadísticament significatius en el nombre de cèl·lules vives, apoptòtiques i mortes, respecte els controls. A les 24 hores, però, DIF-P8R a 5,5 μM provocava un augment en el nombre de cèl·lules mortes (49%, $p=0,02$). En canvi, no es van observar canvis estadísticament significatius en les cèl·lules cultivades amb DIF-P8R a 0,55 μM . Tot i així, el patró d'aquest tenia certa similitud amb el de les cèl·lules cultivades amb DIF-P3K a 5,5 μM durant 24 hores o, fins i tot, al de les cultivades 24 hores amb DIF-P a 55 μM .

2.3.1.2. Inducció d'apoptosi en cèl·lules de mastocitoma murí: cèl·lules P815

En la figura 37 es mostren els resultats de la incubació de les cèl·lules P815 amb els pèptids DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R a diferents concentracions, així com amb els controls negatius, el pèptid 72 i sense cap mena d'estímul. De la mateixa manera que amb les cèl·lules B16-F10, es va fer una incubació d'una hora i una altra de 24 hores.

En aquest cas, el pèptid DIF-P no tenia cap mena d'efecte citotòxic en les cèl·lules P815 en cap de les dues concentracions testades. El pèptid DIF-P3K, en canvi, sí que presentava cert efecte citotòxic sobre aquest tipus cel·lular, malgrat era més lleu que en les cèl·lules B16-F10. A una concentració de 55 μM induïa un augment en els percentatges de cèl·lules mortes i apoptòtiques respecte els controls negatius. Durant la primera hora de cultiu, el nombre de cèl·lules mortes augmentava fins a un 15% ($p=0,0001$). Aquest augment era molt més clar transcorregudes 24 hores de cultiu, on s'observava un 26% de cèl·lules mortes ($p=0,0001$).

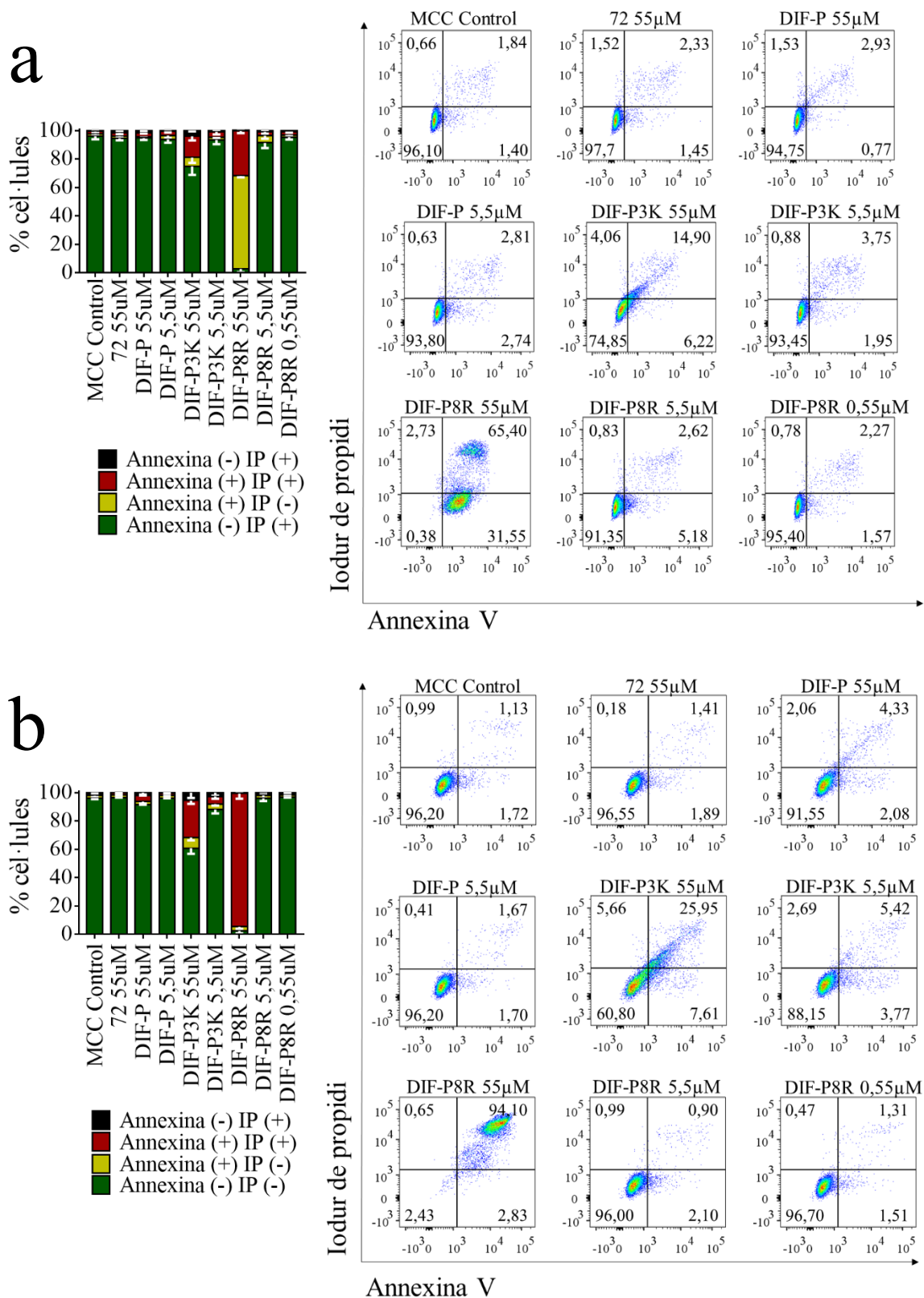


Figura 37. Resultats dels assaigs d'apoptosi amb cèl·lules de mastocitoma murí P815 en cultiu durant 1 hora (a) i 24 hores (b) amb els pèptids DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R a diferents concentracions. Un cop transcorreguts els temps d'incubació, es van tenyir les cèl·lules amb Annexina V i IP per tal de poder diferenciar entre les fases de mort per apoptosi i mort cel·lular. n=3.

El nombre de cèl·lules apoptòtiques també presentava un lleuger augment en ambdós temps, malgrat aquest no era estadísticament significatiu. Al disminuir la concentració de DIF-P3K en el cultiu no es van detectar canvis estadísticament significatius en el nombre de cèl·lules vives, apoptòtiques i mortes. Per últim, el pèptid DIF-P8R a 55 μ M tenia un clar efecte citotòxic en les cèl·lules P815 ja a la primera hora de cultiu, on només un 2,7% de les cèl·lules seguien vives ($p=0,0001$). La majoria havien iniciat un procés apoptòtic (65,4%, $p=0,0001$) que acabava amb un considerable nombre de cèl·lules mortes (31,55%, $p=0,0001$). A les 24 hores de cultiu, aquest efecte citotòxic era molt més evident. Moltes de les cèl·lules que havien iniciat aquest procés apoptòtic ja l'havien finalitzat, havent més d'un 90% de cèl·lules mortes ($p=0,0001$). Al disminuir la concentració de DIF-P8R a 5,5 μ M i 0,55 μ M, no es van observar canvis estadísticament significatius en els percentatges de cèl·lules mortes o apoptòtiques respecte els controls en cap dels dos temps de cultiu.

2.3.2. Ús de DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R com a agents immunoteràpics contra el càncer

Degut al elevat efecte citostàtic així com a els efectes immunoestimuladors dels pèptids derivats de la periferina, es va decidir estudiar el seu potencial com a agents immunoteràpics contra el càncer. Per tal fer-ho, es van realitzar diversos estudis de mort cel·lular immunogènica, tal i com s'ha descrit en l'apartat de *Materials i mètodes*. En el nostre estudi, es van utilitzar les dues línies tumorals murines esmentades anteriorment: la línia P815 i la B16-F10, i es van realitzar diversos protocols d'immunització (taula ICD, *Materials i Mètodes*) per tal de determinar quines són les millors condicions per a protegir els ratolins enfront el creixement del tumor quan s'injecten les cèl·lules tumorals vives i, en conseqüència, quin podria ser el patró d'administració dels pèptids derivats de la periferina en el tractament contra el càncer.

2.3.2.1. *Melanoma B16-F10 en ratolins C57BL/6*

Primer de tot, es van establir les condicions de cultiu (sense estímul, pèptid 72, pèptid 72-8R, DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R) amb les quals les cèl·lules B16-F10 mostraven un 80% de mortalitat. A més a més, per tal d'assegurar millor la mortalitat en tots els grups, i que en el moment de l'administració de la "vacuna" al ratolins no hi haguessin proteïnes procedents del sèrum fetal boví present al medi de cultiu complert, les cèl·lules es van

cultivar en un medi sense nutrients (HBSS 1X) o d'inanició (*starving*). Tal i com es mostra en la figura 38, després de 1 hora de cultiu, s'aconseguia aquesta mortalitat en tots els grups.

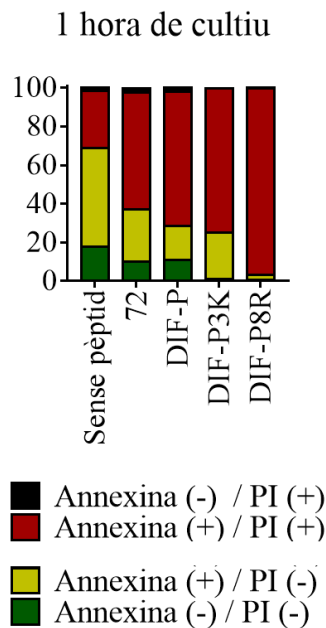


Figura 38. Resultats dels assaigs d'apoptosi amb cèl·lules de melanoma murí B16-F10 en cultiu durant 1 hora en un medi sense nutrients. Les cèl·lules B16-F10 es van tractar amb pèptids DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R així com amb els controls sense pèptid i amb el pèptid 72. Un cop transcorregut el temps d'incubació, es van tenyir les cèl·lules amb Annexina V i IP per tal de poder diferenciar entre les fases de mort per apoptosi i mort cel·lular.

Una sola immunització de cèl·lules incubades durant 1 hora amb els diferents pèptids

En el primer estudi d'ICD que es va realitzar, es van immunitzar ratolins de 6 a 8 setmanes d'edat amb les cèl·lules B16-F10 tractades durant 1 hora amb els diferents estímuls. La implantació de les cèl·lules tumorals vives es va fer 7 dies més tard i es va monitoritzar el seu creixement cada 2-3 dies fins al final de l'estudi (figura 39).

Tal i com es mostra en la figura 40, un dels set ratolins tractats amb una sola immunització de cèl·lules B16-F10 tractades durant 1 hora amb DIF-P3K no va desenvolupar cap tumor. A més a més, dels 6 ratolins en que sí que hi havia creixement tumoral, aquest era més lent. Aquests resultats van indicar que DIF-P3K era capaç d'induir una resposta antitumoral total o amb una protecció parcial ($p=0,02$) enfront al desenvolupament de melanoma en ratolins C57BL/6. Sorprenentment, els ratolins immunitzats amb cèl·lules B16-F10 tractades amb DIF-P presentaven un creixement tumoral molt ràpid, lleugerament inferior al dels controls vacunats amb HBSS 1X, similar al dels controls de les cèl·lules B16-F10 incubades amb el pèptid 72 i lleugerament superior al dels controls de B16-F10 sense estímulo. Els ratolins immunitzats amb les cèl·lules tractades amb DIF-P8R tampoc presentaven diferències en el creixement tumoral respecte els controls.

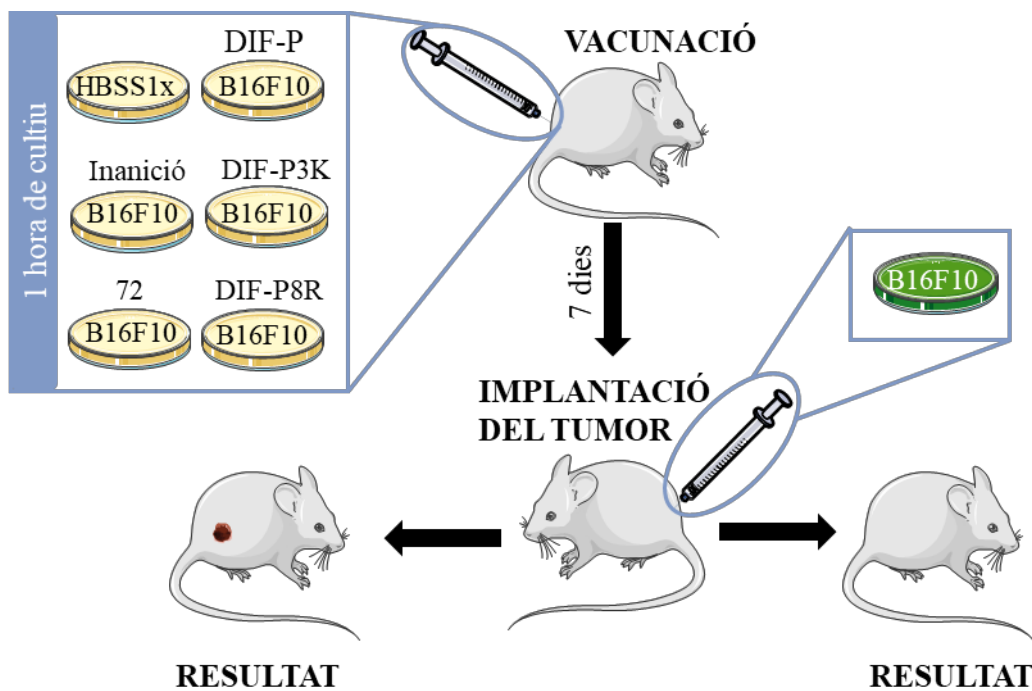


Figura 39. Disseny experimental de l'estudi d'ICD amb una sola immunització de cèl·lules B16-F10 incubades durant 1 hora amb els diferents pèptids.

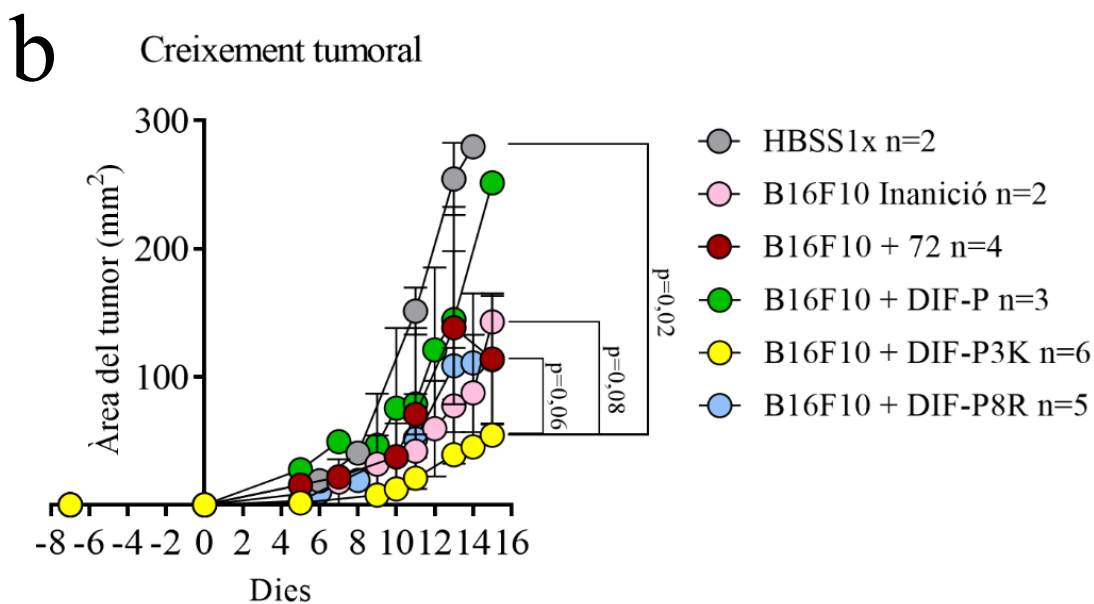
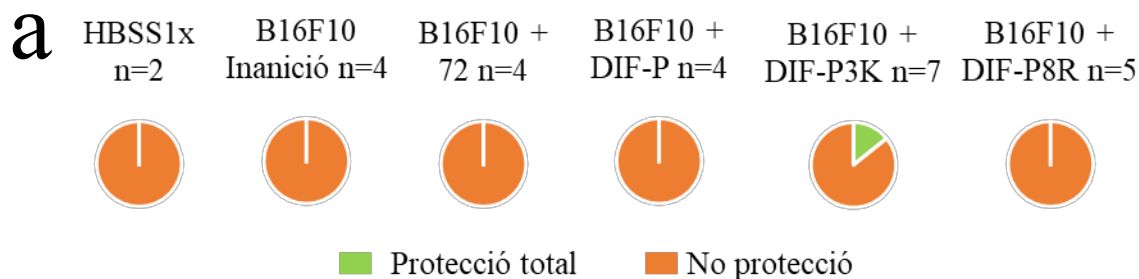


Figura 40. Experiment d'ICD amb una sola immunització de cèl·lules B16-F10 incubades durant 1 hora amb els diferents pèptids. (a) Protecció total vs. No protecció. (b) Seguiment del creixement tumoral.

Malauradament, malgrat els prometedors resultats obtinguts, el tractament d'una sola hora de les cèl·lules tumorals amb els diferents estímuls no va ser suficient per a evitar el creixement tumoral en el lloc d'injecció de la vacuna. Per tal d'intentar solucionar aquesta inconvenient, es van realitzar altres experiments d'ICD, descrits a continuació.

Una sola immunització de cèl·lules incubades durant 16 hores amb els diferents pèptids

Com que les cèl·lules incubades amb els diferents estímuls durant una sola hora eren capaces de generar tumor en el lloc de la vacuna malgrat presentar un 80% de mortalitat en els assajos d'Annexina i Iodur de Propí, es va decidir allargar el temps d'incubació d'aquestes amb els diferents estímuls fins a 16 hores. Una setmana després de vacunar als ratolins, es van injectar les cèl·lules tumorals vives i es va fer un seguiment del creixement tumoral cada 2-3 dies fins al final de l'estudi (figura 41).

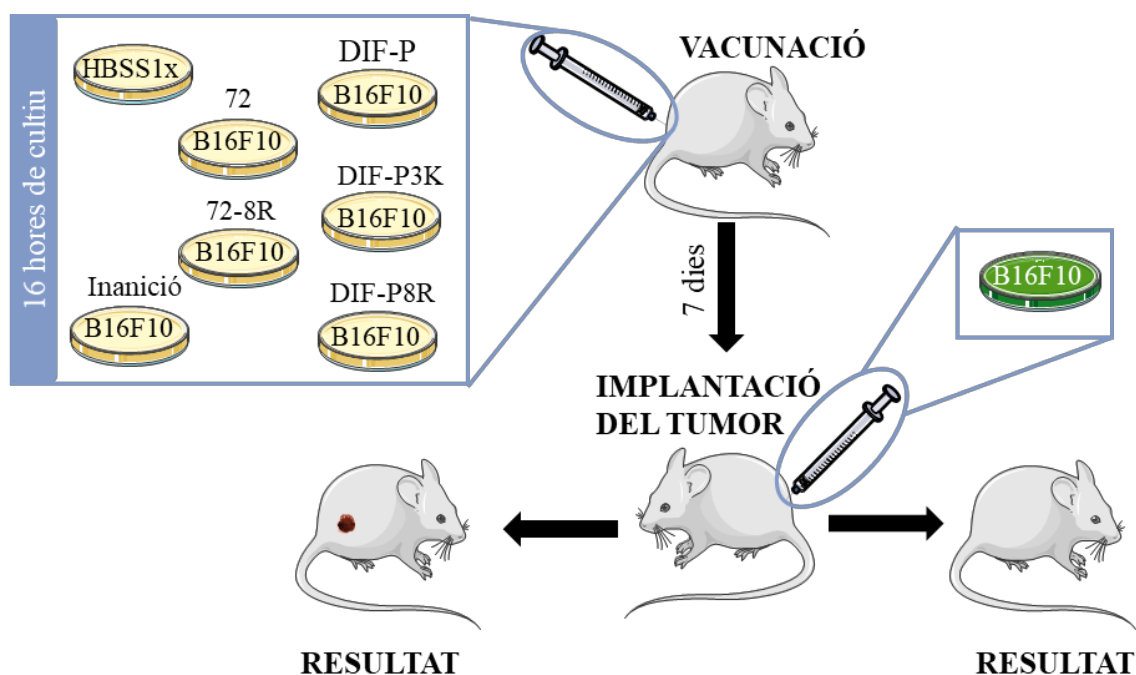


Figura 41. Disseny experimental de l'estudi d'ICD amb una sola immunització de cèl·lules B16-F10 incubades durant 16 hores amb els diferents pèptids.

En aquest cas, dos dels tres ratolins vacunats amb les B16-F10 tractades amb DIF-P8R no van desenvolupar tumor en el lloc d'implantació d'aquest (figura 42a). Tot i així, els resultats d'aquest experiment no són molt clars ja que el control amb HBSS 1X no desenvolupaven tumors especialment grans i, en canvi, els ratolins vacunats amb les cèl·lules tractades amb DIF-P3K, que en l'experiment anterior estaven protegits parcial o

totalment del creixement tumoral, en aquest desenvolupaven tumors molt ràpidament (figura 42b).

A més a més, tot i veure un elevat percentatge de mortalitat en els experiments d'Annexina V i IP quan tractàvem les cèl·lules amb els diferents estímuls durant 16 hores, els ratolins seguien desenvolupant tumors al lloc de la vacuna.

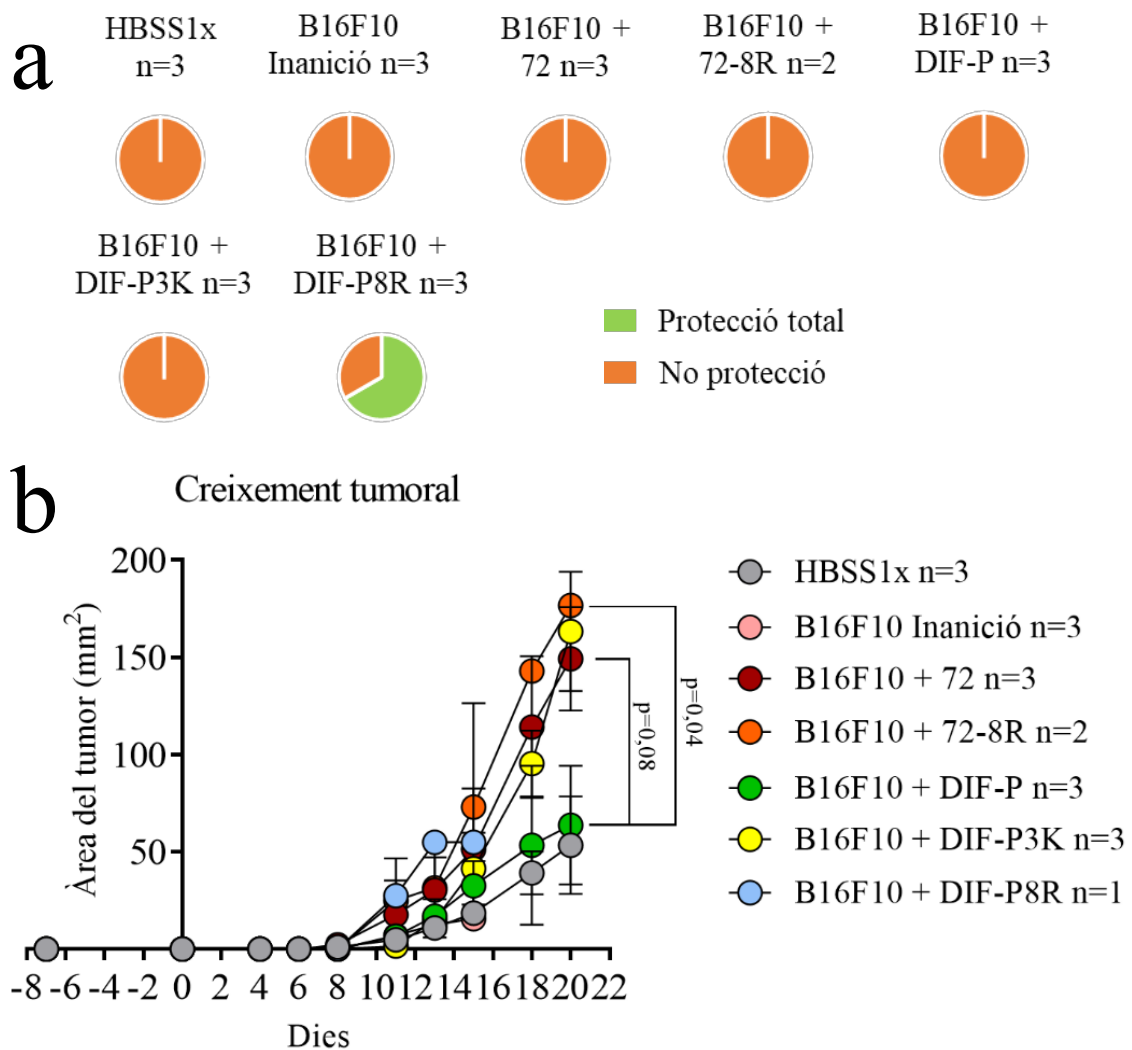


Figura 42. Experiment d'ICD amb una sola immunització de cèl·lules B16-F10 incubades durant 16 hores amb els diferents pèptids. (a) Protecció total vs. No protecció. (b) Seguiment del creixement tumoral.

Una sola immunització de cèl·lules incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids i congelació posterior

Per tal d'intentar evitar el creixement tumoral derivat de la injecció de la vacuna, es van tractar les cèl·lules B16-F10 durant 24 hores amb els diferents estímuls i, posteriorment, es van congelar directament a -80°C un mínim de 24 hores. El resultat d'aquest protocol és la obtenció d'immunitzacions amb gairebé un 100% de mort cel·lular. De la mateixa manera

que en els casos anteriors, es van immunitzar els ratolins amb els diferents tractaments i, 7 dies després, es van injectar les cèl·lules tumorals vives i es va fer un seguiment del creixement tumoral cada 2-3 dies fins al final de l'estudi (figura 43).

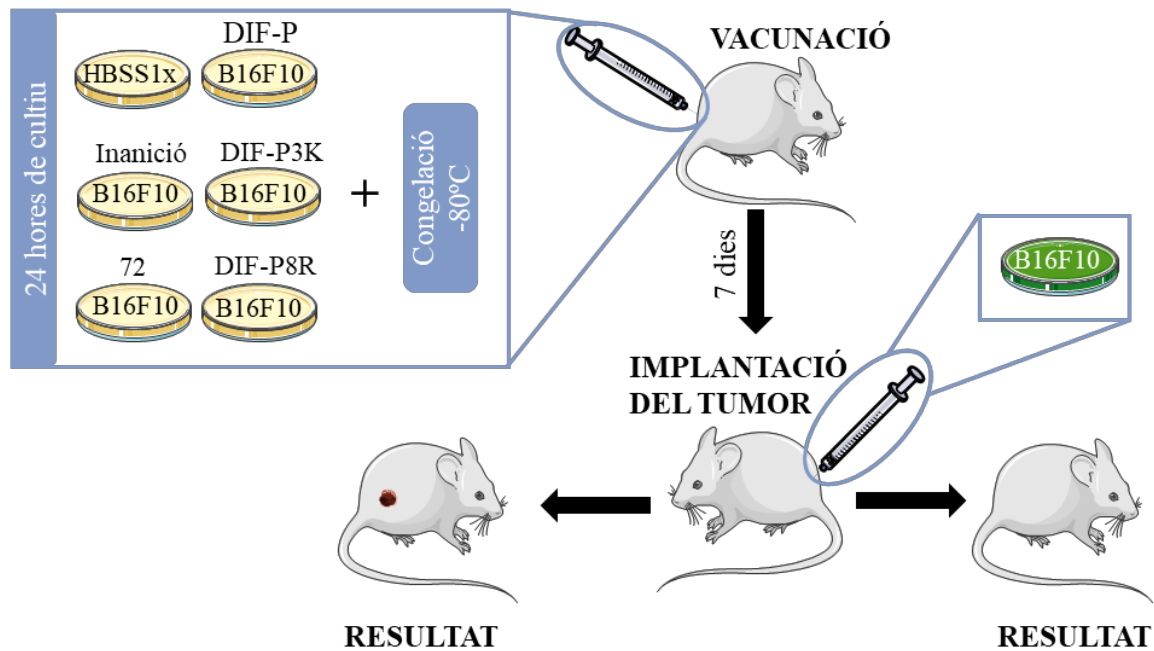


Figura 43. Disseny experimental de l'estudi d'ICD amb una sola immunització de cèl·lules B16-F10 incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids i congelades, posteriorment, a -80°C.

La congelació de les immunitzacions va permetre eliminar la problemàtica de la generació de tumors en els llocs d'injecció d'aquestes. Tal i com es mostra en la figura 44, en aquest cas no va haver cap dels tractaments que proveís d'una protecció total als ratolins. Sí que sembla, però, que DIF-P8R podria estar protegint parcialment als ratolins, ja que sembla que en aquests el creixement tumoral era més lent ($p=0,06$). Malgrat que les diferències no són estadísticament significatives, DIF-P també semblava reduir la velocitat de creixement del tumor.

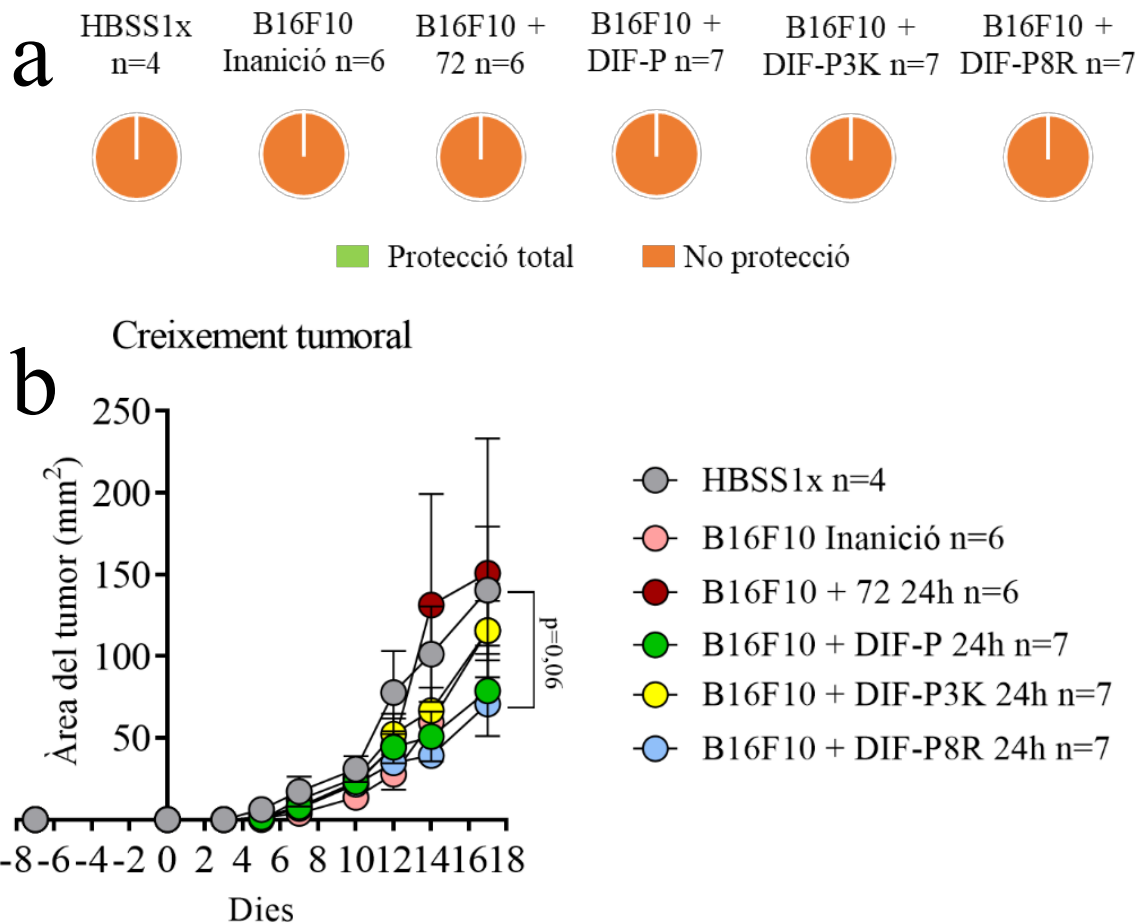


Figura 44. Experiment d'ICD amb una sola immunització de cèl·lules B16-F10 incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids i congelades, posteriorment, a -80°C. (a) Protecció total vs. No protecció. (b) Seguiment del creixement tumoral.

Tres immunitzacions de cèl·lules incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids i congelació posterior

En vista dels resultats obtinguts en els experiments anteriors, es va decidir provar de fer diverses immunitzacions als ratolins per tal d'intentar generar una major resposta immunitària envers als tumors. Els ratolins es van vacunar 3 vegades, amb una separació de 15 dies entre puncions, i 15 dies després de l'última immunització es van injectar les cèl·lules tumorals vives (figura 45). Per a la immunització es va decidir tractar les cèl·lules tumorals durant 24 hores amb els diferents estímuls i congelar-les posteriorment, ja que en experiments anteriors s'havia demostrat que així s'evitava el creixement tumoral en el lloc de la immunització.

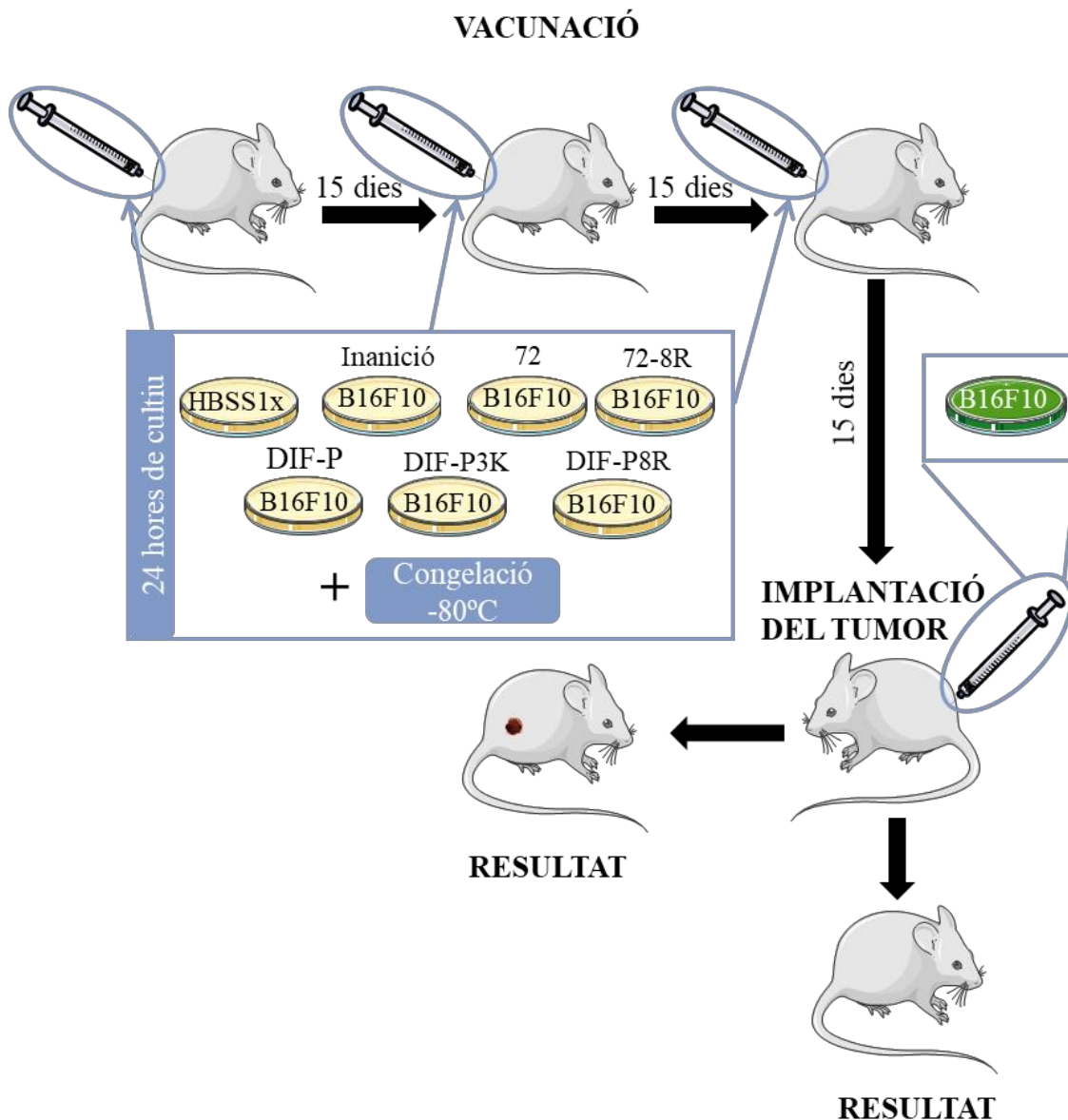


Figura 45. Disseny experimental de l'estudi d'ICD amb tres immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules B16-F10 incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids i posteriorment congelades.

Curiosament, dos dels 4 ratolins tractats amb les cèl·lules incubades amb DIF-P presentaven una protecció total enfront l'aparició de melanoma (figura 46a), és a dir, el 50% dels ratolins immunitzats no van desenvolupar cap tumor. A més a més, els 2 ratolins restants del grup presentaven una protecció parcial enfront al creixement tumoral, ja que aquest era molt més lent que en la resta de grups (figura 46b). A més a més, des del moment en que es va fer la primera immunització, es va fer també un seguiment del pes dels ratolins, així com del seu aspecte general, activitat física i agressivitat, entre d'altres, per tal de determinar els possibles efectes adversos de les nostres vacunes. Cap de les vacunes subministrades va provocar una disminució del percentatge de pes que pogués ser

indicativa d'una reacció adversa (Figura 2, Annex). Els ratolins tampoc van mostrar en cap moment un canvi en el pelatge, l'activitat física o l'agressivitat.

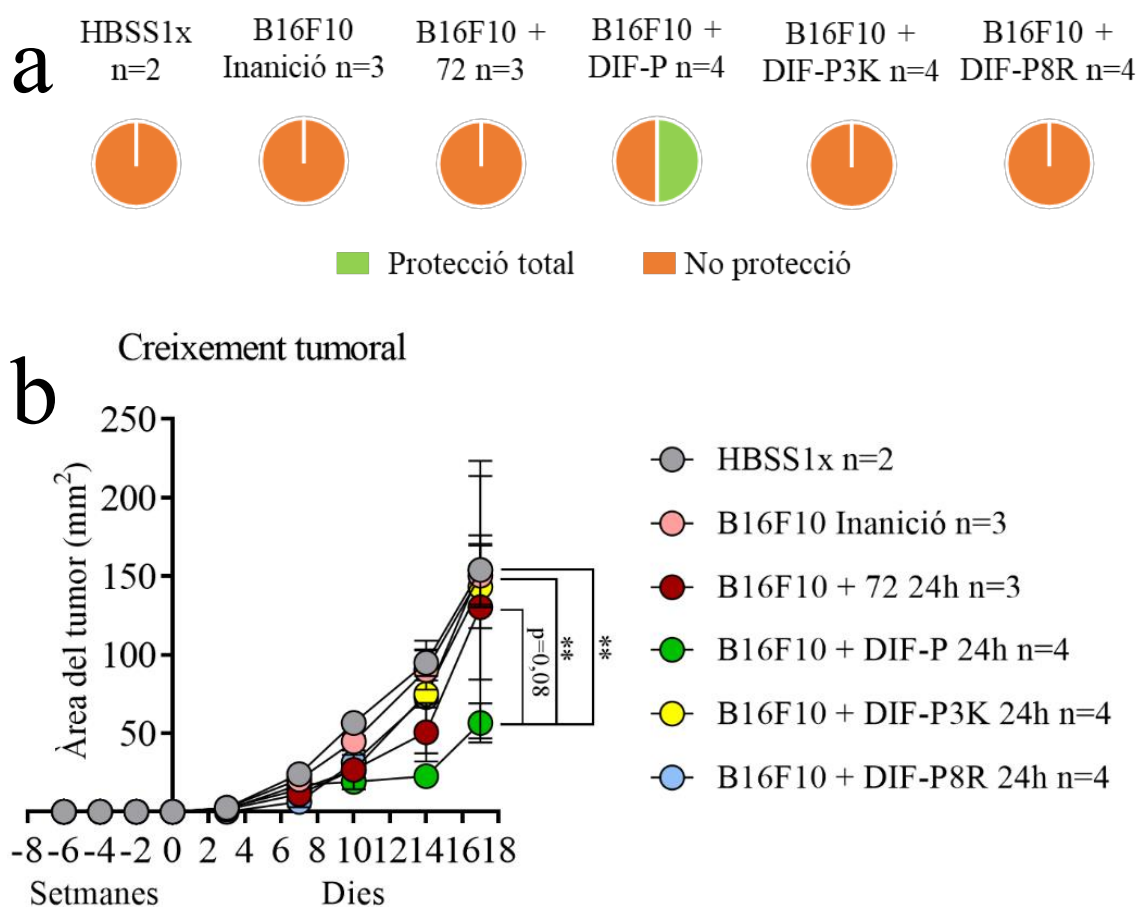


Figura 46. Experiment d'ICD amb tres immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules B16-F10 incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids i posteriorment congelades. (a) Protecció total vs. No protecció. (b) Seguiment del creixement tumoral.

Tres immunitzacions de cèl·lules incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids i DMSO i congelació posterior

Estudis previs del nostre grup, havien demostrat que quan els pèptids estaven dissolts en DMSO, induïen una superior producció de citocines proinflamatòries *in vitro*. És per això que es va decidir afegir DMSO a la preparació de la vacuna per tal d'intentar promoure en el ratolí una major resposta immunitària contra el tumor. Es va seguir el mateix protocol d'immunització que en la figura 45 amb l'única diferència en la presència de DMSO en els cultius. Per tant, els ratolins es van immunitzar 3 vegades, amb una separació de 15 dies entre punccions i 15 dies després de l'última immunització, es van injectar les cèl·lules tumorals vives i es va fer el seguiment del creixement tumoral en dies alterns. En aquest cas, també es va fer un seguiment del pes dels ratolins així com del seu aspecte general,

activitat física i agressivitat, entre d'altres. De la mateixa manera que les vacunes sense DMSO, no s'observava una pèrdua de pes significativa en cap dels grups deguda a l'administració de les vacunes que pogués ser indicativa d'una reacció adversa (figura 3, Annex), ni tampoc cap alteració en l'aparença física o el comportament dels ratolins.

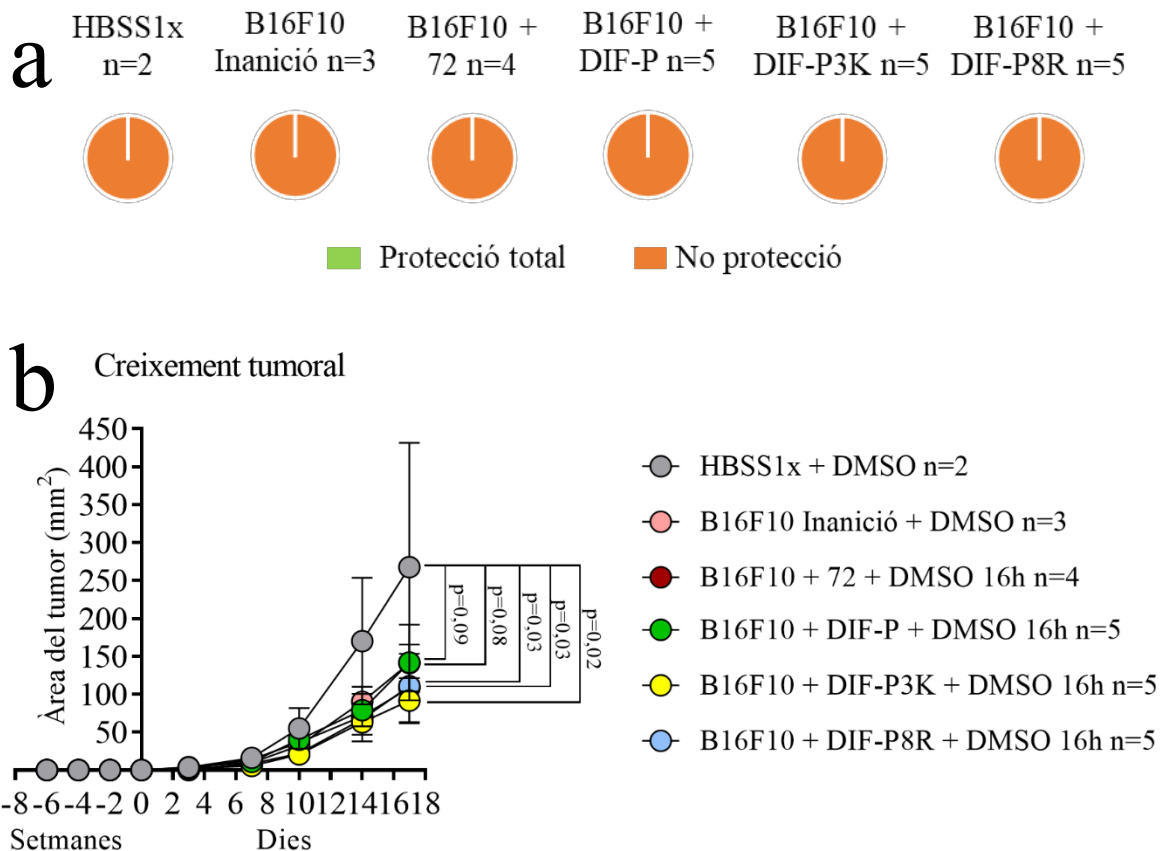
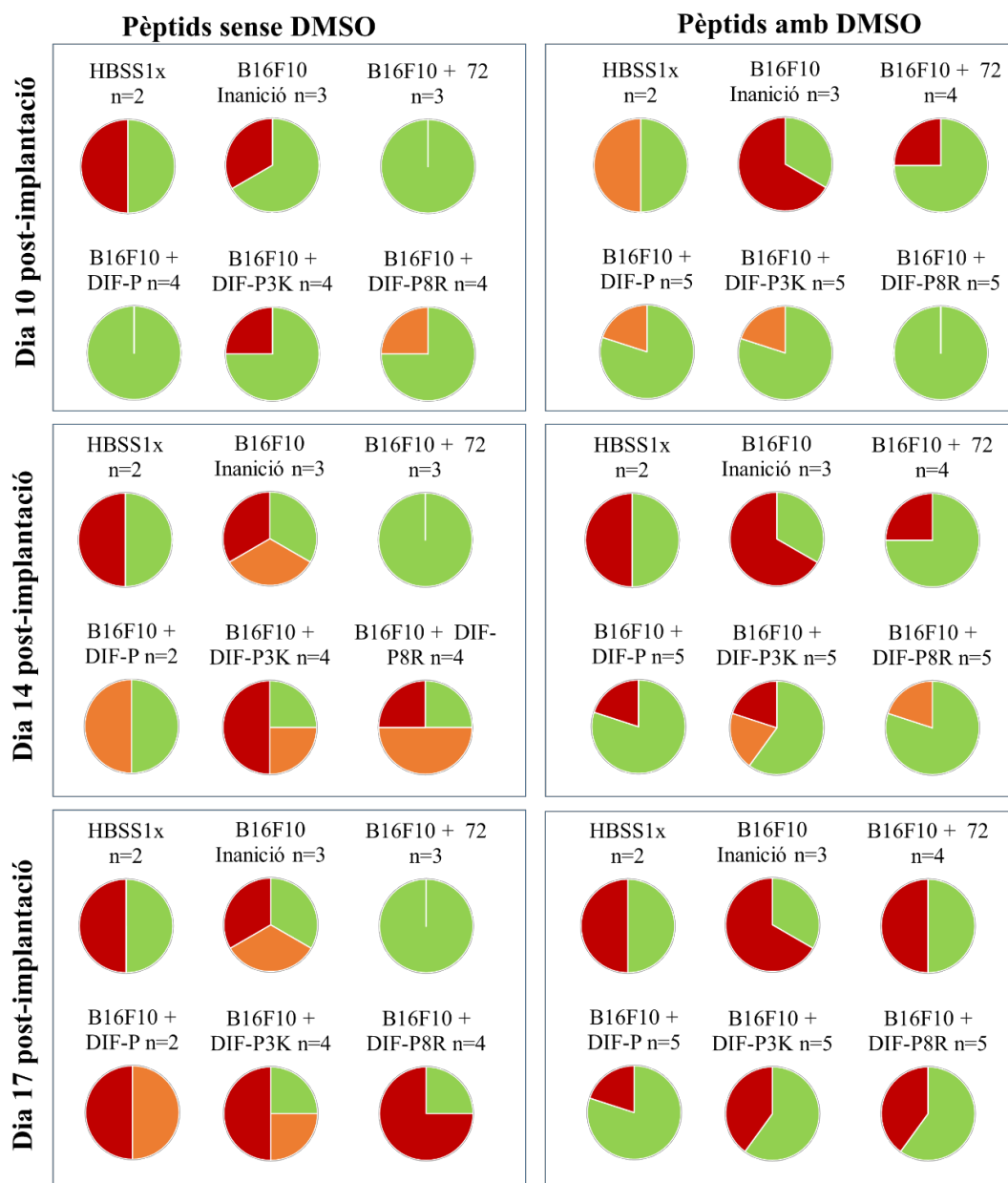


Figura 47. Experiment d'ICD amb tres immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules B16-F10 incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids i DMSO, i posteriorment congelades. (a) Protecció total vs. No protecció. (b) Seguiment del creixement tumoral.

Tal i com s'observa en la figura 47, no va haver cap tractament que proveís als ratolins d'una protecció total enfront al desenvolupament de melanoma. En aquest cas, es va observar una petita protecció parcial en forma de retard en el creixement tumoral en tots els grups amb presència de les cèl·lules tumorals mortes en la vacuna en comparació amb els ratolins vacunats només amb HBSS 1X (sense estímul, $p=0,09$; 72, $p=0,03$; DIF-P, $p=0,08$; DIF-P3K, $p=0,02$; DIF-P8R, $p=0,03$), independentment de l'adjuvant afegit, la qual cosa reforça la importància dels DAMPs en la resposta immunitària envers als tumors.



■ No hi ha necrosi al tumor ■ Hi ha inici de necrosi al tumor ■ Hi ha necrosi clara al tumor

Figura 48. Desenvolupament de necrosi en els tumors després de 10, 14 i 17 dies de la seva implantació. Els ratolins van ser immunitzats 3 vegades, amb una separació de 15 dies entre puncions. Les vacunes estaven formades per cèl·lules B16-F10 incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids, amb i sense DMSO, i posteriorment congelades.

Quan es van comparar els resultats de les vacunes amb DMSO (figura 47) amb els de les vacunes sense aquest (figura 46), es va observar que el DMSO no procura cap avantatge als ratolins pel que fa a la progressió tumoral en el lloc d'implantació de les cèl·lules B16-F10. Curiosament, però, la presència conjunta de DMSO i els pèptids derivats de la periferina en la vacuna semblava evitar o retardar la formació de necrosi en el tumor, les quals són considerades un signe de malignitat tumoral (figura 48).

Tres immunitzacions de cèl·lules incubades amb DIF-P3K durant 1 hora i congelació posterior

Gràcies als experiments anteriors, vam veure que en funció del temps d'incubació de les cèl·lules amb els diferents pèptids el resultat que obteníem era diferent. Mentre que quan incubàvem les cèl·lules durant 1 hora, el pèptid que protegia als ratolins de desenvolupar un tumor era el pèptid DIF-P3K, quan les cultivàvem 16 i 24 hores, els pèptids protectors eren el DIF-P8R i el DIF-P, respectivament. En vista d'aquests resultats, es va decidir augmentar el nombre d'immunitzacions mantenint el temps d'incubació en el qual els pèptids eren més efectius per tal de millorar la protecció enfront al desenvolupament del melanoma. D'aquesta manera, es va decidir realitzar 3 immunitzacions de les cèl·lules tractades amb DIF-P3K durant 1 hora i posteriorment congelades (figura 49).

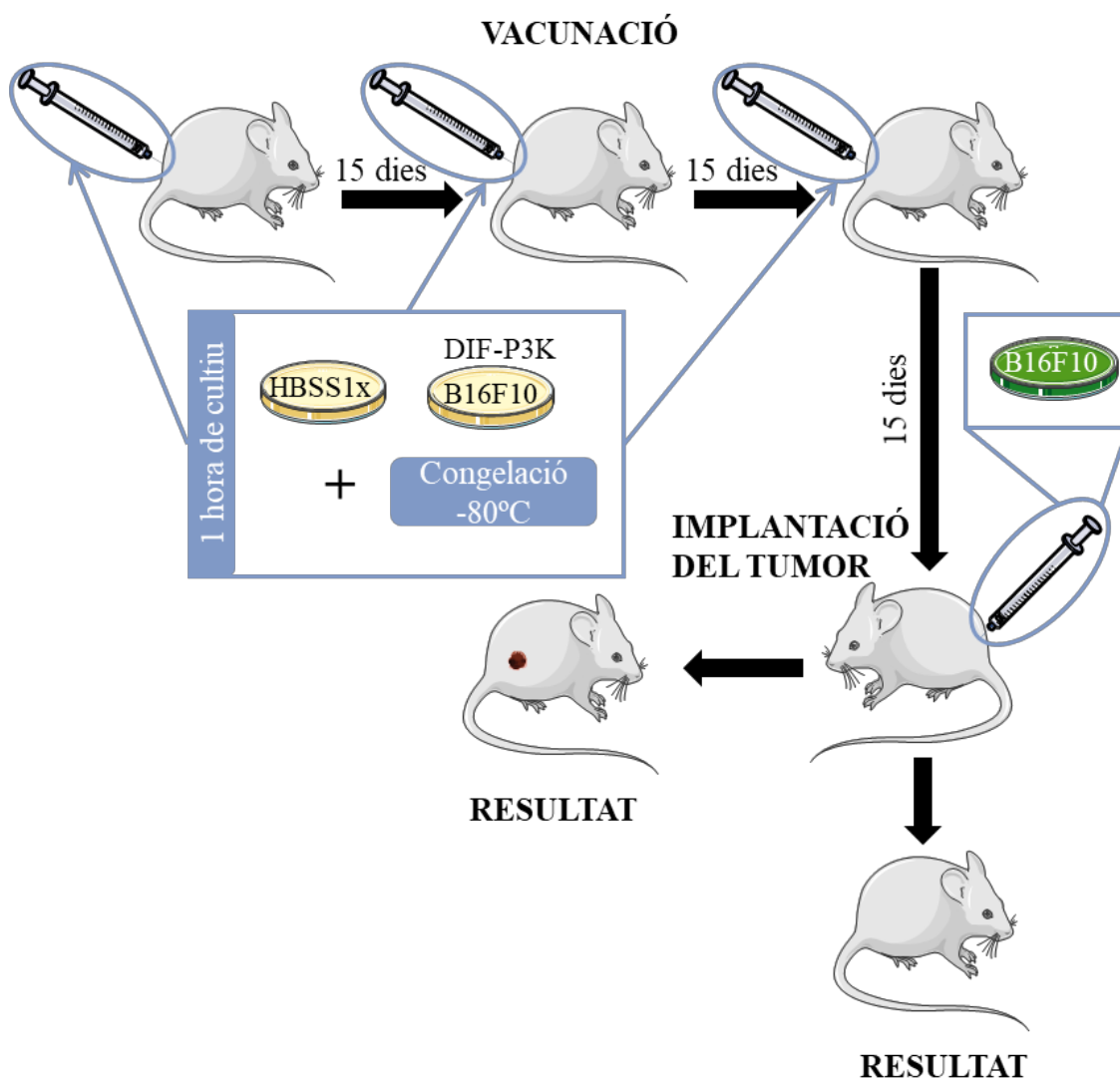


Figura 49. Disseny experimental de l'estudi d'ICD amb tres immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules B16-F10 incubades durant 1 hora amb DIF-P3K, i posteriorment congelades.

Malgrat tots els ratolins van desenvolupar tumors en el lloc d'implantació de les cèl·lules B16-F10, el creixement d'aquest era més lent que el del control amb HBSS 1X ($p=0,04$). Per tant, malgrat no es va poder observar una protecció total en cap dels ratolins (figura 50a), sí que es podia intuir una protecció parcial (figura 50b).

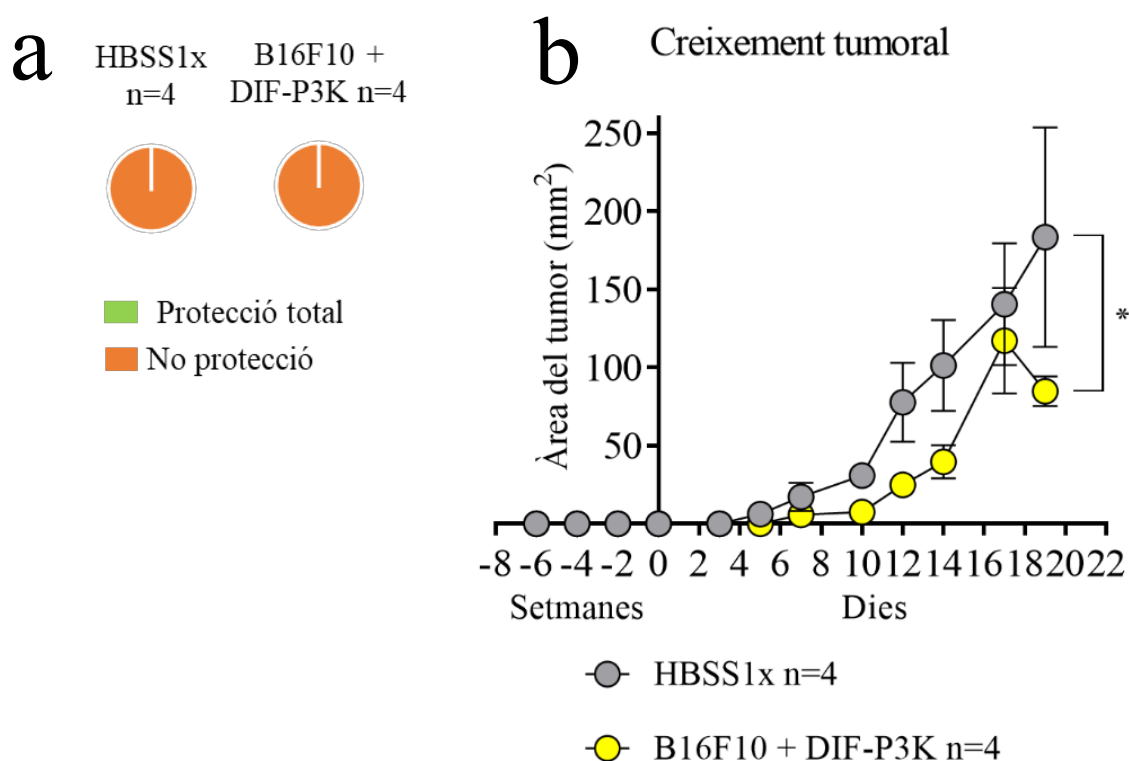


Figura 50. Experiment d'ICD amb tres immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules B16-F10 incubades durant 1 hora amb DIF-P3K, i posteriorment congelades. (a) Protecció total vs. No protecció. (b) Seguiment del creixement tumoral.

Tres immunitzacions de cèl·lules incubades amb DIF-P8R durant 16 hores i congelació posterior

De la mateixa manera que amb DIF-P3K, es va augmentar el nombre d'immunitzacions amb les cèl·lules cultivades 16 hores amb DIF-P8R per tal d'intentar millorar la protecció enfront al desenvolupament del melanoma. Es van realitzar, per tant, realitzar 3 immunitzacions de les cèl·lules tractades amb DIF-P8R durant 16 hores i posteriorment congelades (figura 51).

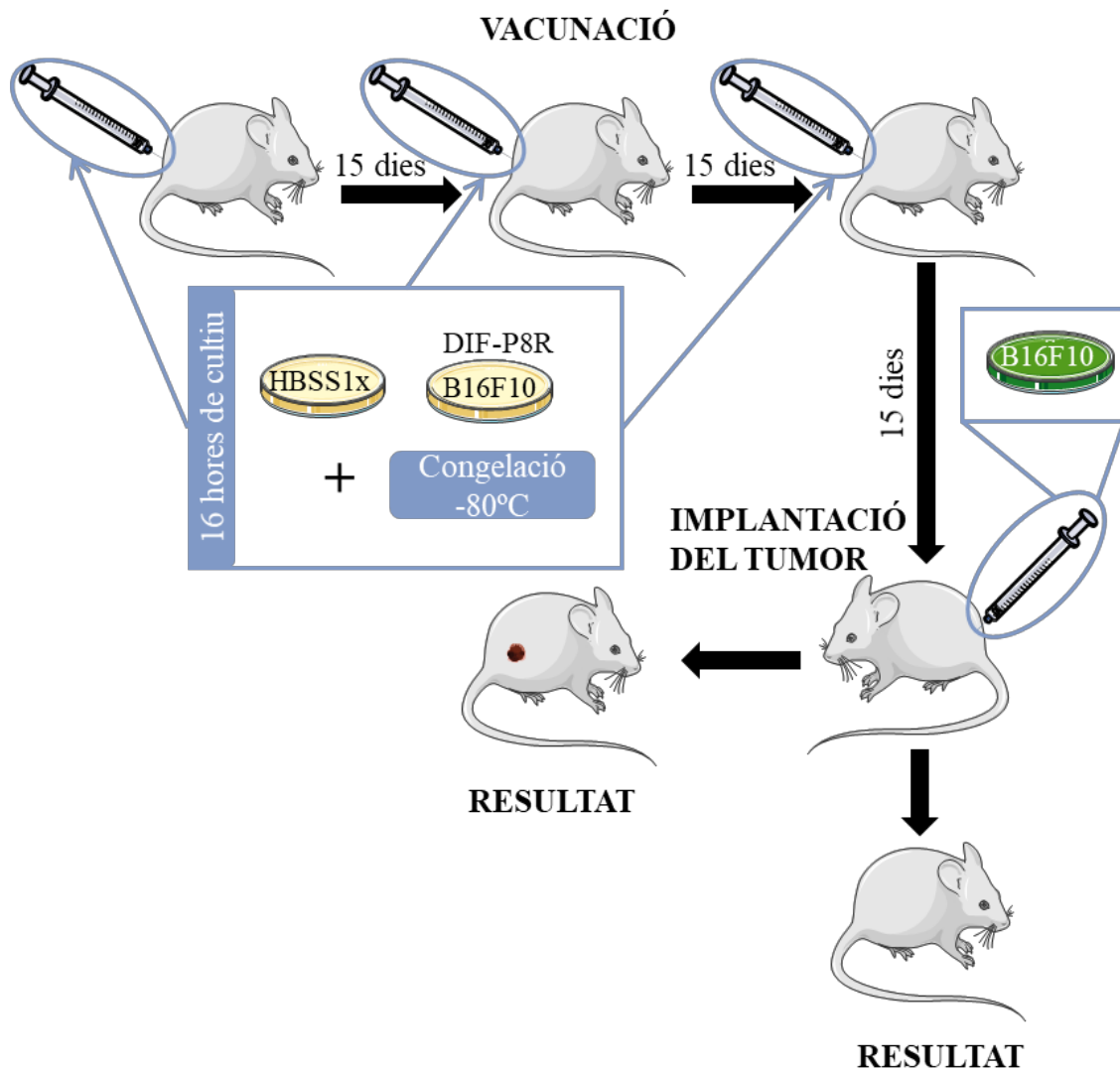


Figura 51. Disseny experimental de l'estudi d'ICD amb tres immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules B16-F10 incubades durant 16 hores amb DIF-P8R, i posteriorment congelades.

Tal i com es mostra en la figura 52, un dels 5 ratolins immunitzats amb aquest pèptid no va desenvolupar cap tumor en el lloc d'implantació de les cèl·lules B16-F10. A més a més, semblava que els 4 ratolins restants ho feien a una velocitat menor que els controls vacunats amb HBSS 1X ($p=0,04$), la qual cosa suggereix que aquests presentaven una protecció parcial envers al desenvolupament de melanoma.

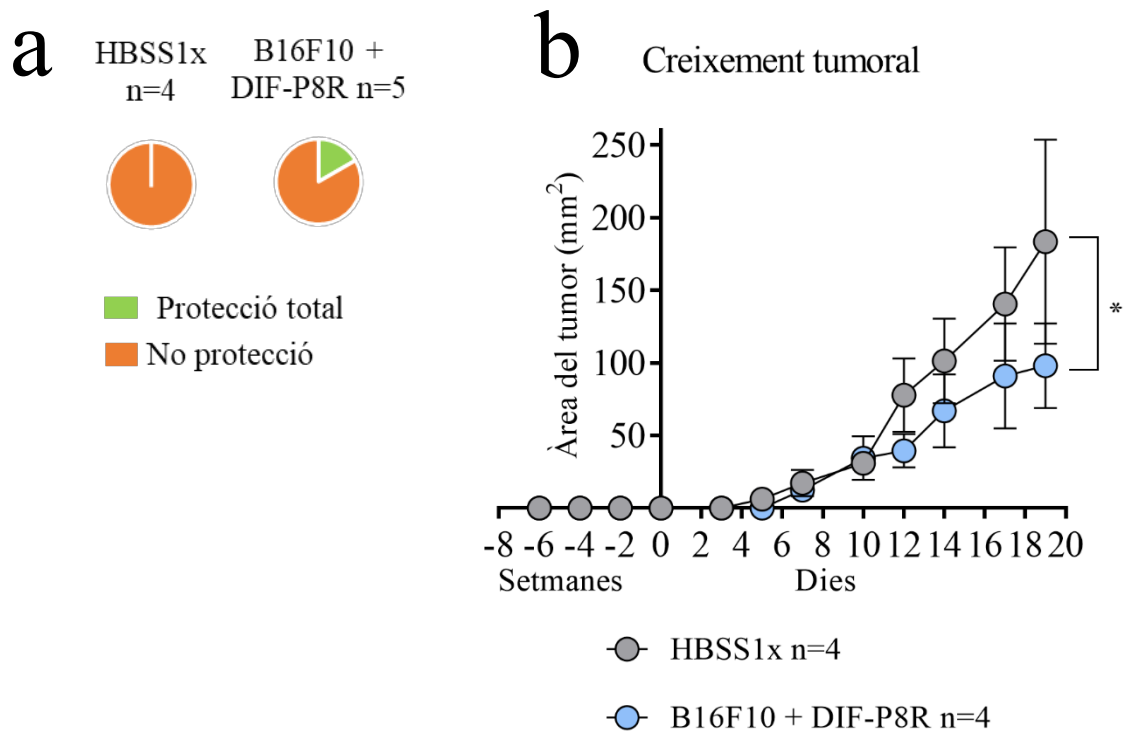
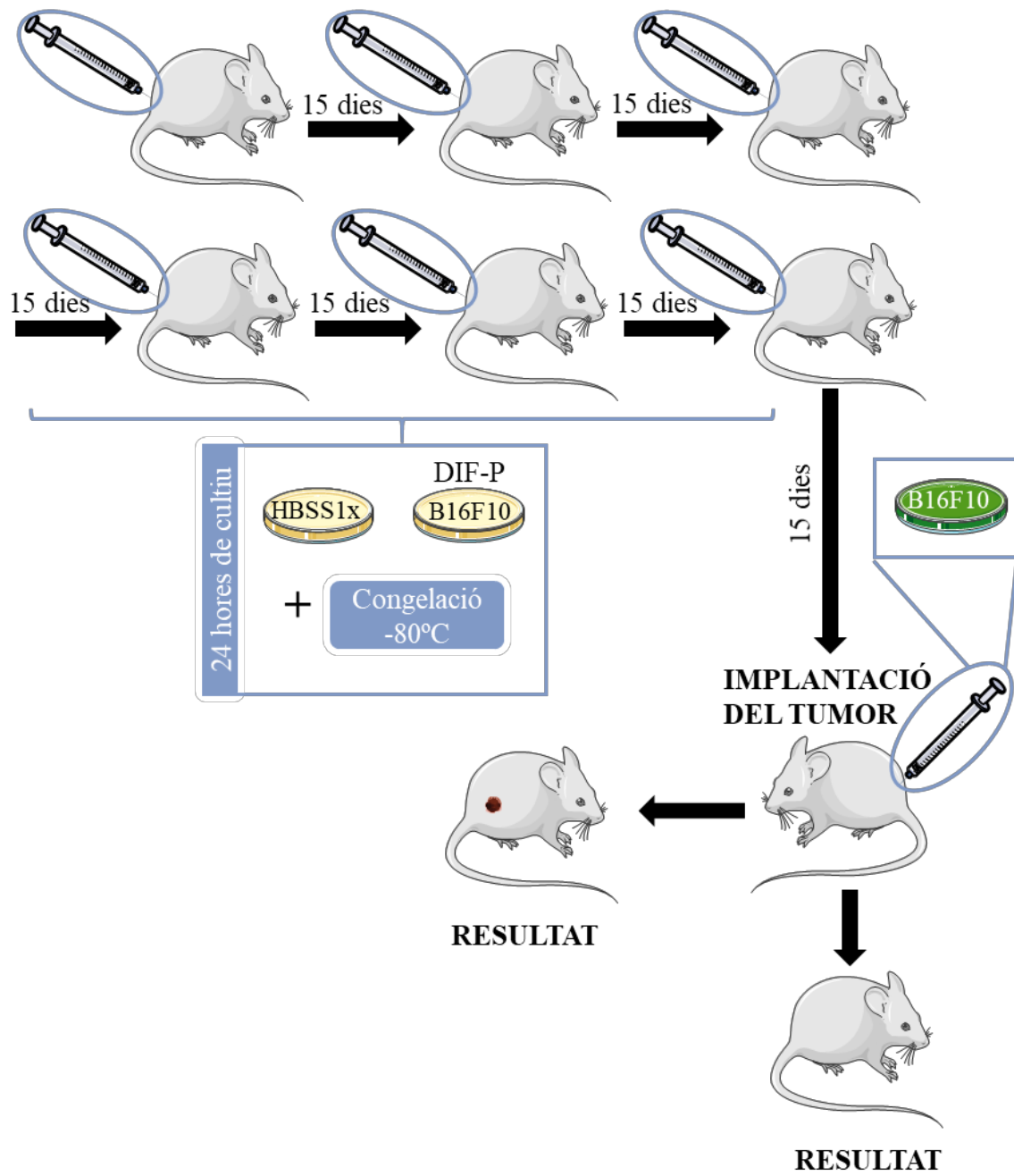


Figura 52. Experiment d'ICD amb tres immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules B16-F10 incubades durant 16 hores amb DIF-P8R, i posteriorment congelades. (a) Protecció total vs. No protecció. (b) Seguiment del creixement tumoral.

Sis immunitzacions de cèl·lules incubades amb DIF-P durant 24 hores i congelació posterior

Com que els millors resultats obtinguts amb DIF-P fins al moment havien estat amb ratolins immunitzats 3 vegades, en aquest cas es va augmentar el nombre d'immunitzacions fins a 6. Les cèl·lules es van cultivar durant 24 hores amb DIF-P i, posteriorment, es van congelar a -80°C fins al moment de vacunar als ratolins (figura 53). En aquest cas, malgrat tots els ratolins van desenvolupar melanoma en el lloc d'implantació de les cèl·lules, aquest creixia de manera molt més lenta que el control amb HBSS 1X ($p=0,003$), suggerint que hi havia una protecció parcial envers el desenvolupament tumoral (figura 54).

VACUNACIÓ



RESULTATS

Figura 51. Disseny experimental de l'estudi d'ICD amb sis immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules B16-F10 incubades durant 24 hores amb DIF-P, i posteriorment congelades.

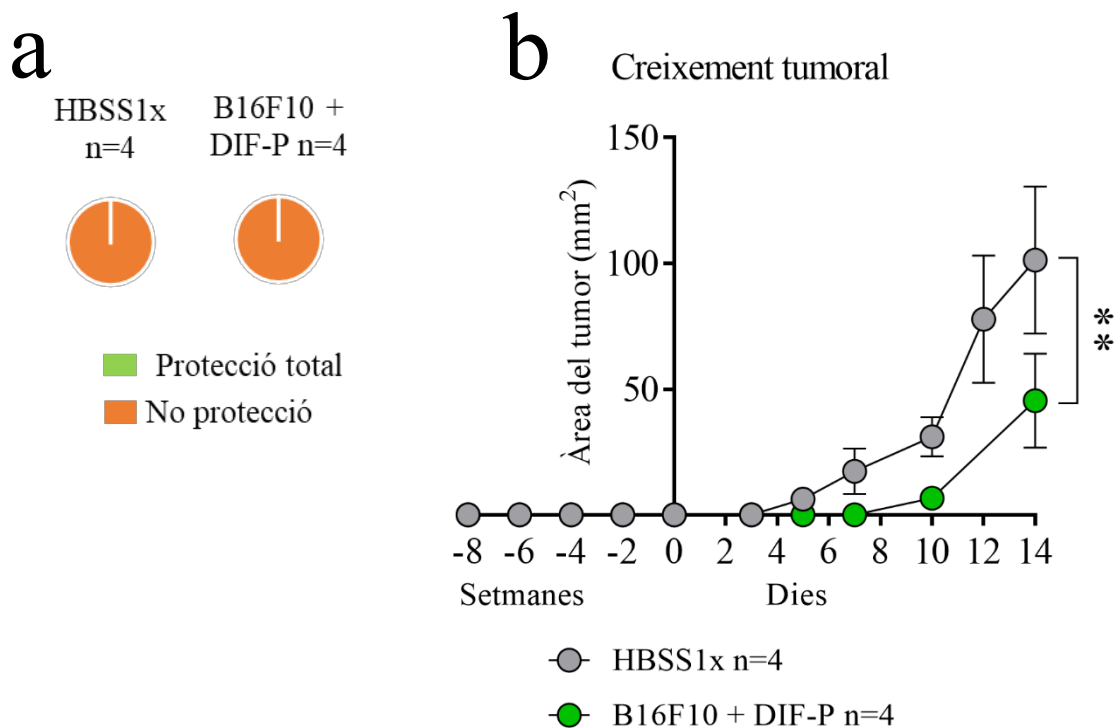


Figura 54. Experiment d'ICD amb sis immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules B16-F10 incubades durant 24 hores amb DIF-P, i posteriorment congelades. (a) Protecció total vs. No protecció. (b) Seguiment del creixement tumoral.

Tres immunitzacions de cèl·lules incubades amb DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R i congelació posterior

Per últim, i tenint en compte tots els resultats obtinguts fins al moment, es va intentar realitzar una pauta d'immunització que inclogués tots els pèptids que, en una condició o altra, havien protegit a algun dels ratolins de desenvolupar tumor. Es van realitzar 3 immunitzacions diferents, cadascuna d'elles amb un pèptid, separades entre si per 15 dies (figura 55). Per tant, primer es van immunitzar els ratolins amb cèl·lules B16-F10 tractades amb DIF-P durant 24 hores. Passats 15 dies, se'ls va injectar les cèl·lules tractades durant una hora amb DIF-P3K. Per últim, transcorreguts 15 dies de la segona immunització, es van vacunar els ratolins amb cèl·lules tractades amb DIF-P8R durant 16 hores. Totes les vacunes van ser congelades a -80°C abans de la seva administració.

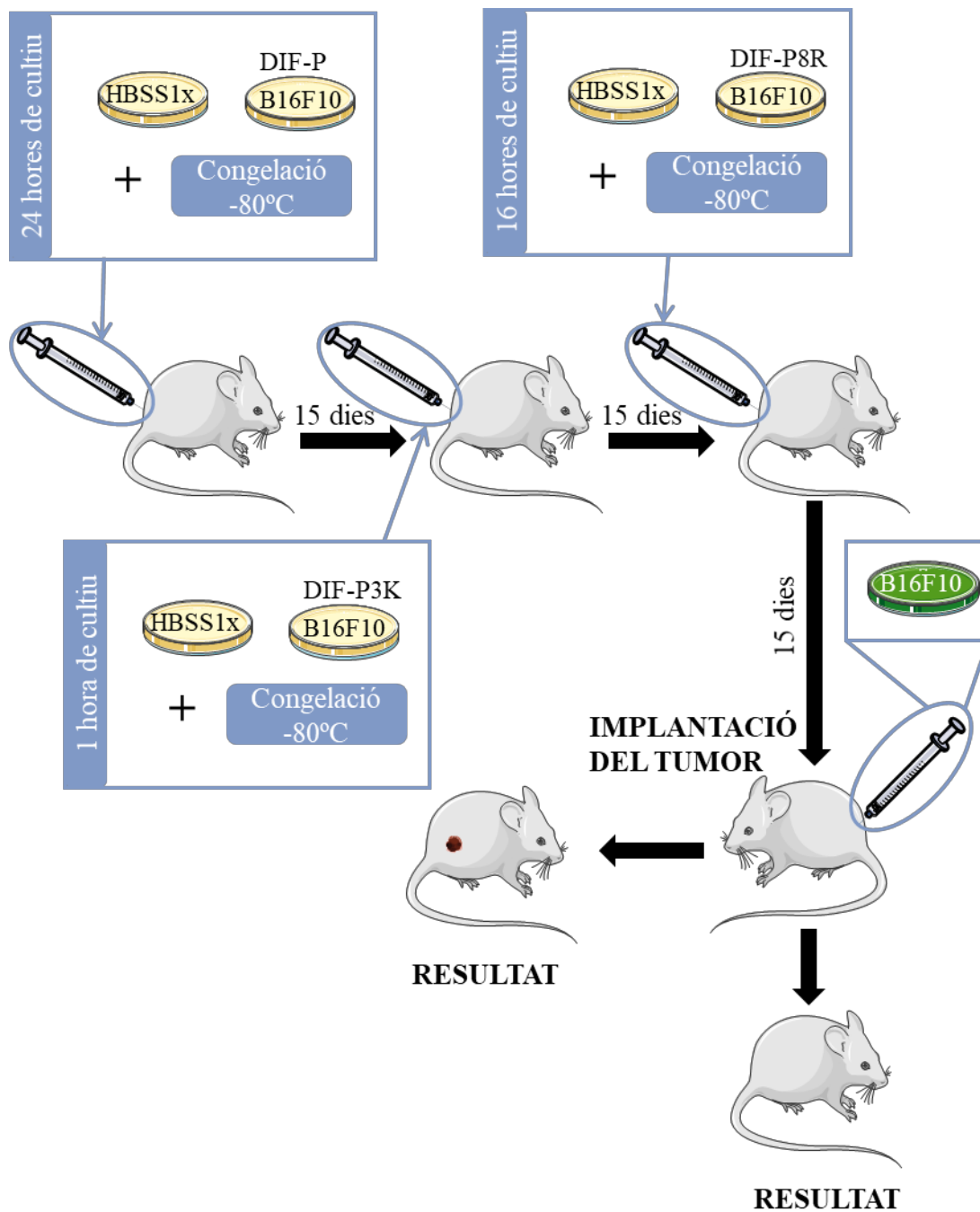


Figura 55. Disseny experimental de l'estudi d'ICD amb tres immunitzacions, cada 15 dies. Cada immunització es va realitzar amb les cèl·lules B16-F10 tractades amb un pèptid diferent.

Tal i com es mostra en la figura 56, cap dels ratolins presentava una protecció total enfront al desenvolupament de melanoma. Tot i així, els resultats semblen indicar que aquesta pauta d'immunitzacions també protegeix de manera parcial als ratolins, ja que el creixement tumoral en aquests és més lent que en el grup control ($p=0,03$).

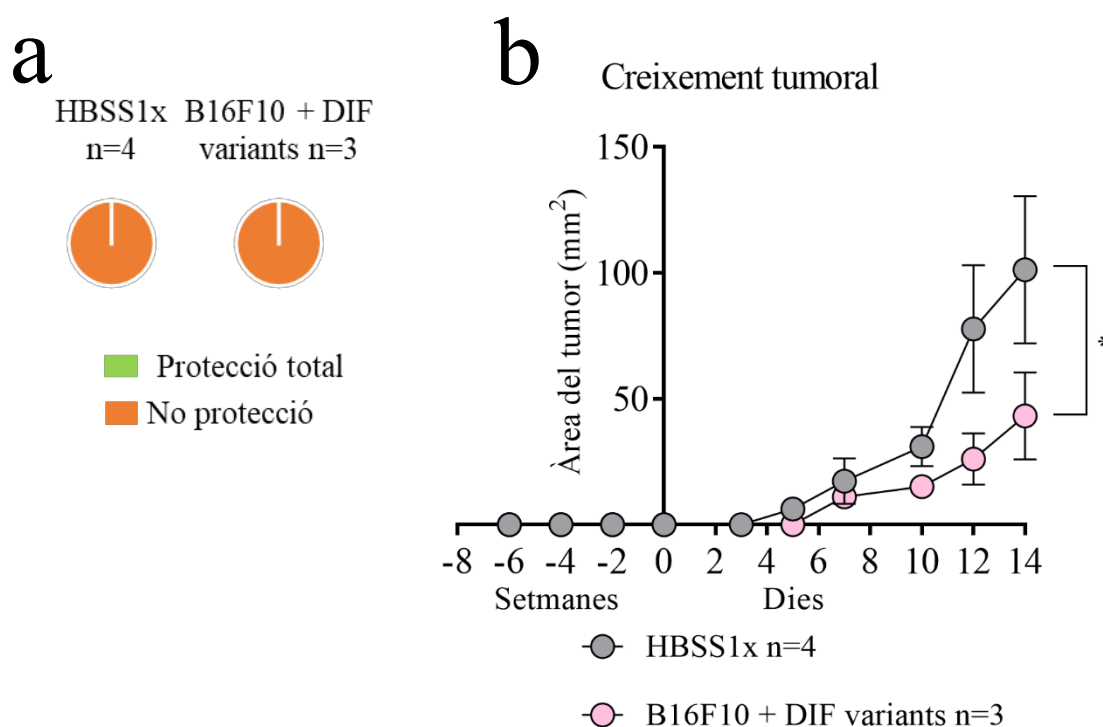


Figura 56. Experiment d'ICD amb tres immunitzacions, cada 15 dies. Cada immunització es va realitzar amb les cèl·lules B16-F10 tractades amb un pèptid diferent. (a) Protecció total vs. No protecció. (b) Seguiment del creixement tumoral.

2.3.2.2. Estudis IL-2/IFN

Un cop demostrat que les vacunes d'ICD podien alentar o, fins i tot, impedir el creixement tumoral, el següent pas va ser demostrar que això era degut a una activació del sistema immunitari, el qual atacava les cèl·lules tumorals vives implantades un cop completada la pauta d'immunització (*challenge*) i n'impedia la seva proliferació. Per fer-ho, es van utilitzar esplenòcits de ratolins immunitzats tal i com es descriu en la taula 14. Aquests es van cultivar juntament amb cèl·lules tumorals B16-F10 durant 24 hores i, posteriorment, es va realitzar un anàlisi de secreció de IL-2 i IFN γ , mitjançant citometria de flux.

Taula 14. Pauta d'immunització dels ratolins.

Ratolí	Condicions de cultiu	Temps d'incubació	Congelació a -80°C	Nombre d'immunitzacions	Temps entre injeccions
C57BL/6	B16-F10 en HBSS 1X (Control)	24 hores	Sí	3	15 dies
C57BL/6	B16-F10 + DIF-P	24 hores	Sí	3	15 dies
C57BL/6	B16-F10 + DIF-P3K	1 hora	Sí	3	15 dies
C57BL/6	B16-F10 + DIF-P8R	16 hores	Sí	3	15 dies

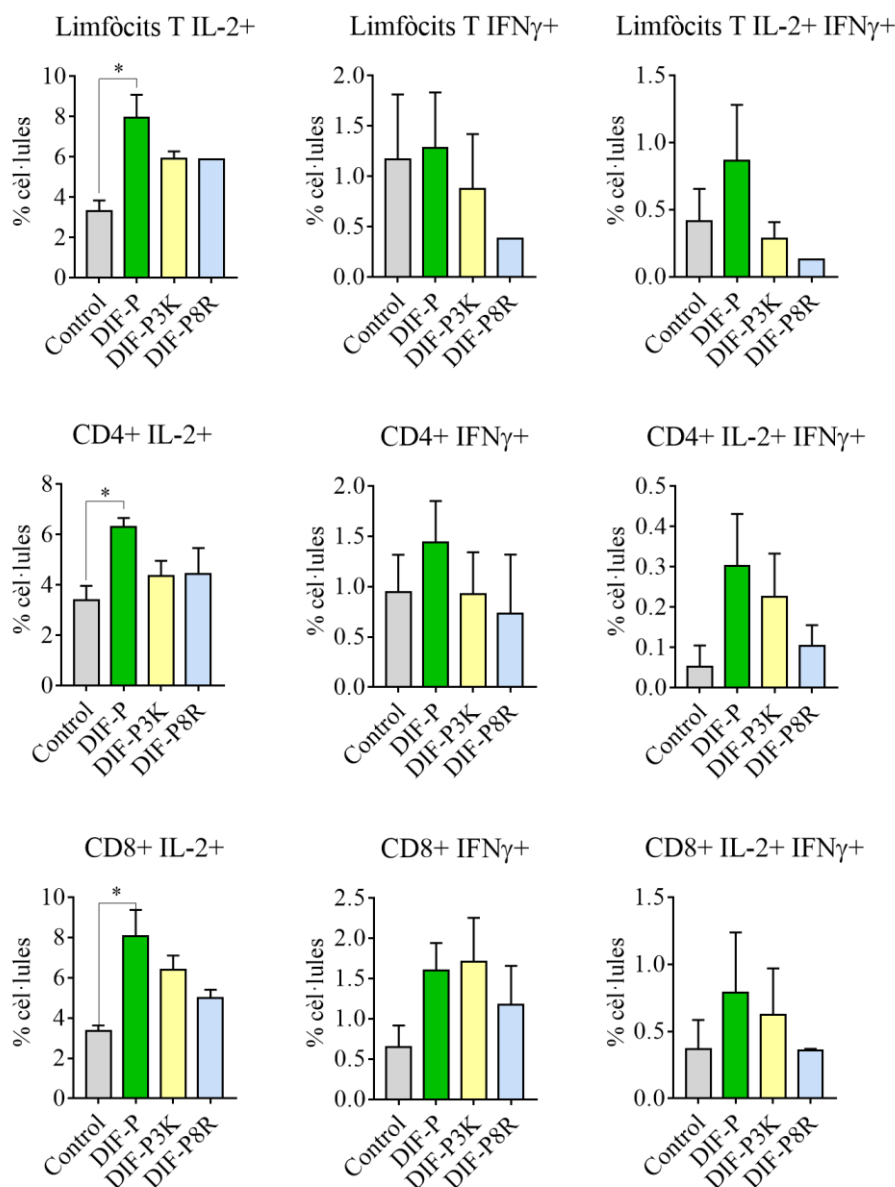


Figura 57. Expressió d'IL-2 i IFN γ per part dels limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ procedents de melses de ratolins immunitzats amb diverses vacunes. Els ratolins es van immunitzar amb cèl·lules B16-F10 en HBSS 1X (Control) o bé amb cèl·lules B16-F10 amb els pèptids DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R. Van rebre 3 dosis de les vacunes, espaiades entre elles per 15 dies. n=3.

Tal i com es mostra en la figura 57, els resultats semblen indicar que, en comparació amb els ratolins control, els ratolins vacunats amb DIF-P presentaven una major quantitat de limfòcits T, tant CD4⁺ com CD8⁺, productors d'IL-2 o IFN γ així com d'ambdues citocines, malgrat en la majoria de casos no són estadísticament significatius. DIF-P3K i DIF-P8R també semblaven tenir una major població de limfòcits T CD4⁺ o CD8⁺ productora d'aquestes citocines, tot i que els valors no eren tan elevats com en els ratolins vacunats amb DIF-P. En conjunt, aquests resultats suggereixen que la immunització dels ratolins

amb DIF-P i, en menor mesura, amb DIF-P3K i DIF-P8R indueix una resposta específica major contra les cèl·lules B16-F10 que en absència d'aquests pèptids. Els limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ d'aquests ratolins eren capaços de secretar citocines proinflamatòries en contacte amb les cèl·lules tumorals, la qual cosa seria capaç d'iniciar una resposta immunitària *in vivo*.

2.3.2.3. Mastocitoma P815 en ratolins DBA/2N

Paral·lelament als estudis *in vivo* amb el model de melanoma, també es van realitzar estudis de mort cel·lular immunogènica amb un model de mastocitoma, utilitzant les cèl·lules P815 derivades d'un mastocitoma murí de ratolins DBA/2N. De la mateixa manera que s'havia fet amb les cèl·lules de melanoma, el primer que es va fer va ser establir les condicions de cultiu amb les quals les cèl·lules P815 de totes les condicions (sense estímulo, 72, 72-8R, DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R) presentaven com a mínim un 80% de mortalitat. Tal i com es mostra en la figura 58, les cèl·lules P815 necessitaven estar en cultiu en un medi sense nutrients un mínim de 24 hores per tal d'aconseguir aquesta mortalitat en tots els grups. Un cop vam determinar que tractaríem les cèl·lules durant 24 hores abans de fer la immunització, es van iniciar els estudis d'ICD.

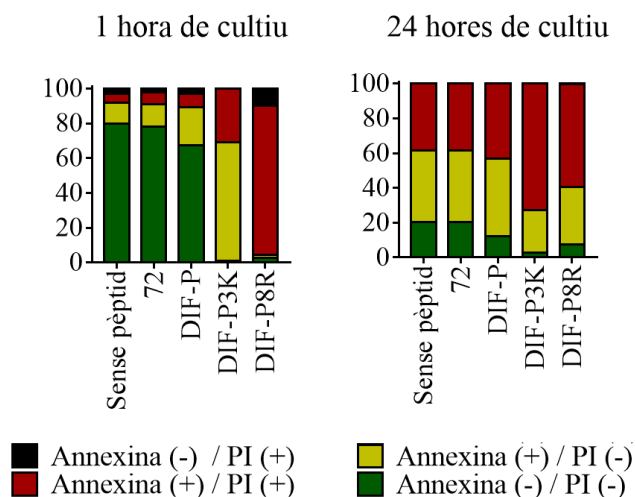


Figura 58. Resultats dels assaigs d'apoptosi amb cèl·lules de mastocitoma murí P815 en cultiu durant una i 24 hores en un medi sense nutrients. Les cèl·lules P815 es van tractar amb pèptids DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R així com amb els controls sense pèptid i amb el pèptid 72. Un cop transcorregut el temps d'incubació, es van tenyir les cèl·lules amb Annexina V i IP per tal de poder diferenciar entre les fases de mort per apoptosi i mort cel·lular.

Una sola immunització de cèl·lules P815 incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids

En el primer estudi d'ICD que es va realitzar, es van immunitzar ratolins de 6-8 setmanes amb les diferents vacunes. Una setmana més tard se'ls van injectar les cèl·lules tumorals vives (challenge) i es va monitoritzar el creixement tumoral en dies alterns fins al final de l'estudi (figura 59).

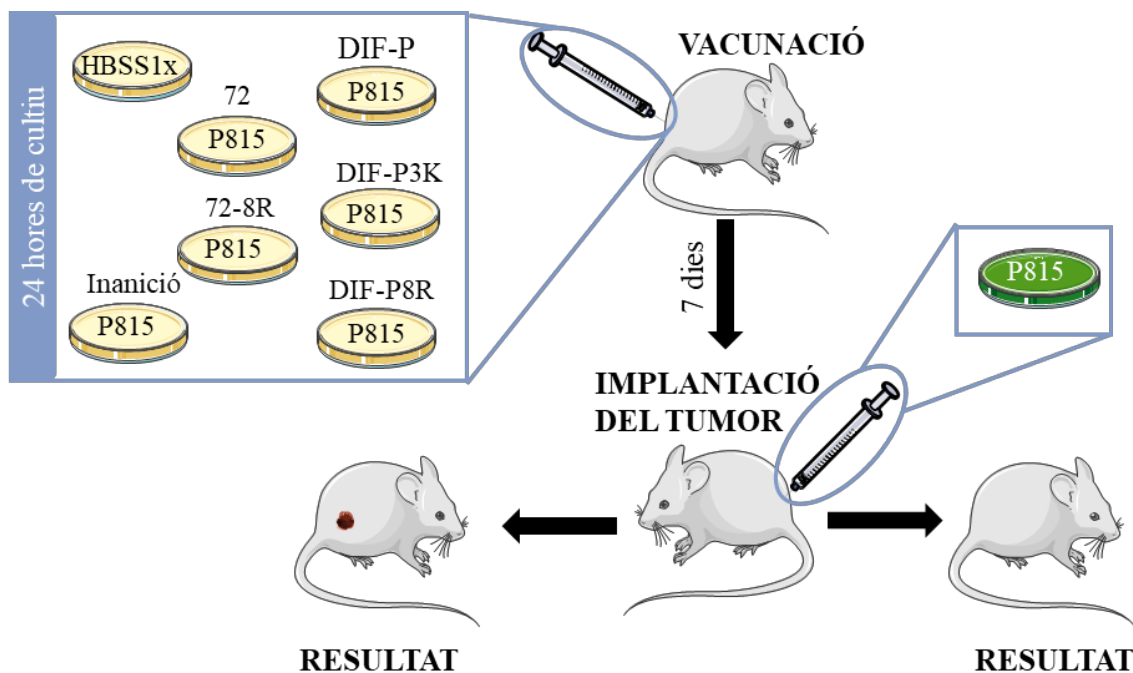


Figura 59. Disseny experimental de l'estudi d'ICD amb una sola immunització de cèl·lules P815 incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids.

En aquestes condicions, DIF-P3K era capaç de protegir totalment a 2 dels 7 ratolins tractats, de manera que aquests no desenvolupaven cap tumor (figura 60). Malgrat en cap dels altres grups es va observar una protecció total, els ratolins tractats amb cèl·lules P815 incubades durant 24 hores amb DIF-P o DIF-P8R semblava que generaven una protecció parcial, essent el creixement del tumor més lent que en els controls amb HBSS 1X i el pèptid 72-8R. A més a més, en algun dels ratolins, els tumors no només disminuïen el seu creixement sinó que semblaven remetre. Caldria fer futurs estudis en aquest sentit per tal de determinar si els pèptids tenen algun efecte en el retrocés del desenvolupament tumoral.

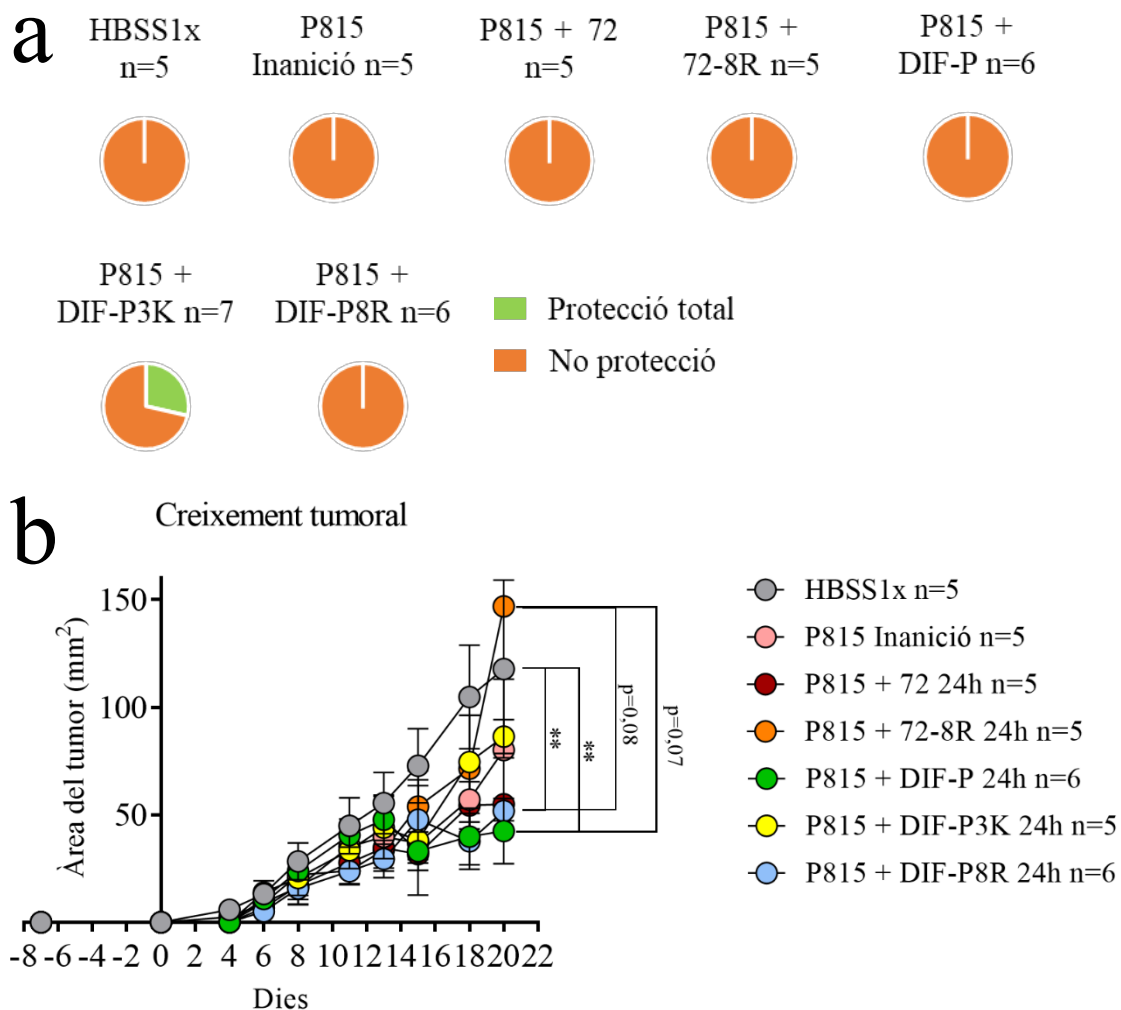


Figura 60. Experiment d'ICD amb una sola immunització de cèl·lules P815 incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids. (a) Protecció total vs. No protecció. (b) Seguiment del creixement tumoral.

Tres immunitzacions de cèl·lules incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids

En vista dels resultats obtinguts amb una sola immunització i amb l'objectiu de millorar l'efectivitat de la vacuna, es van realitzar estudis de mort cel·lular immunogènica en els quals es van fer 3 immunitzacions als ratolins, separades entre elles una setmana, abans de procedir a la injecció de les cèl·lules tumorals vives (figura 61).

Malgrat les cèl·lules de les immunitzacions presentaven una mortalitat superior al 80%, molts dels ratolins d'aquest estudi van desenvolupar tumors al lloc de la vacuna i, en algun cas, es va haver de sacrificar el ratolí abans de poder fer la implantació del tumor. És per això que no es va aconseguir un bon nombre de ratolins en els diversos grups d'aquest experiment. De fet, es va veure que, en aquests ratolins, el creixement tumoral en el lloc del challenge era menor que en els ratolins en els quals no hi havia tumor en el lloc de la immunització, independentment del grup de vacunació al que formessin part. És per això

que no podem concloure un efecte clar dels pèptids en aquest experiment. Tot i així, es va poder observar que el pèptid DIF-P podria arribar a conferir certa protecció enfront al creixement tumoral en comparació amb la resta de grups (figura 62).

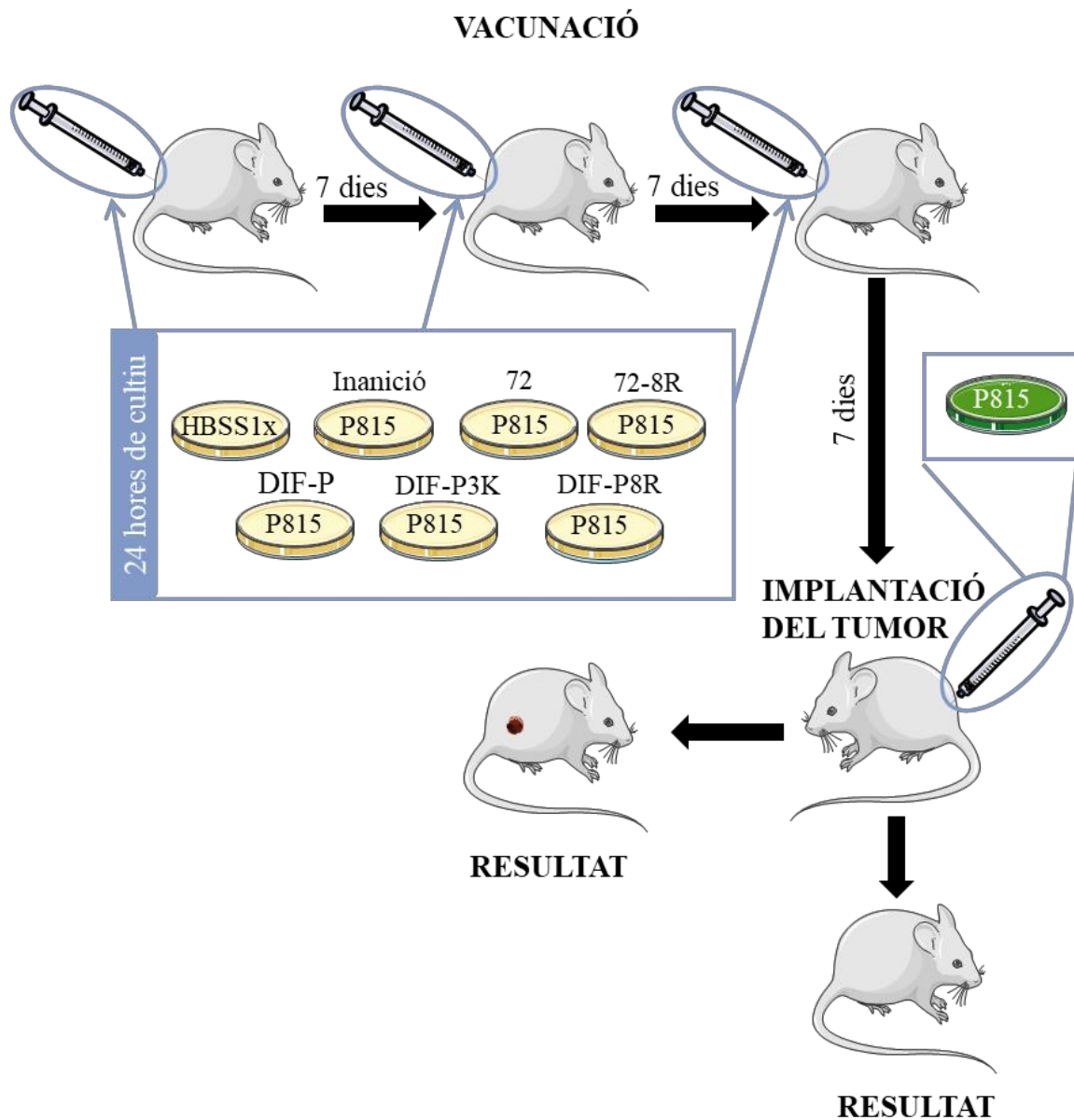


Figura 61. Disseny experimental de l'estudi d'ICD amb tres immunitzacions de cèl·lules P815 incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids.

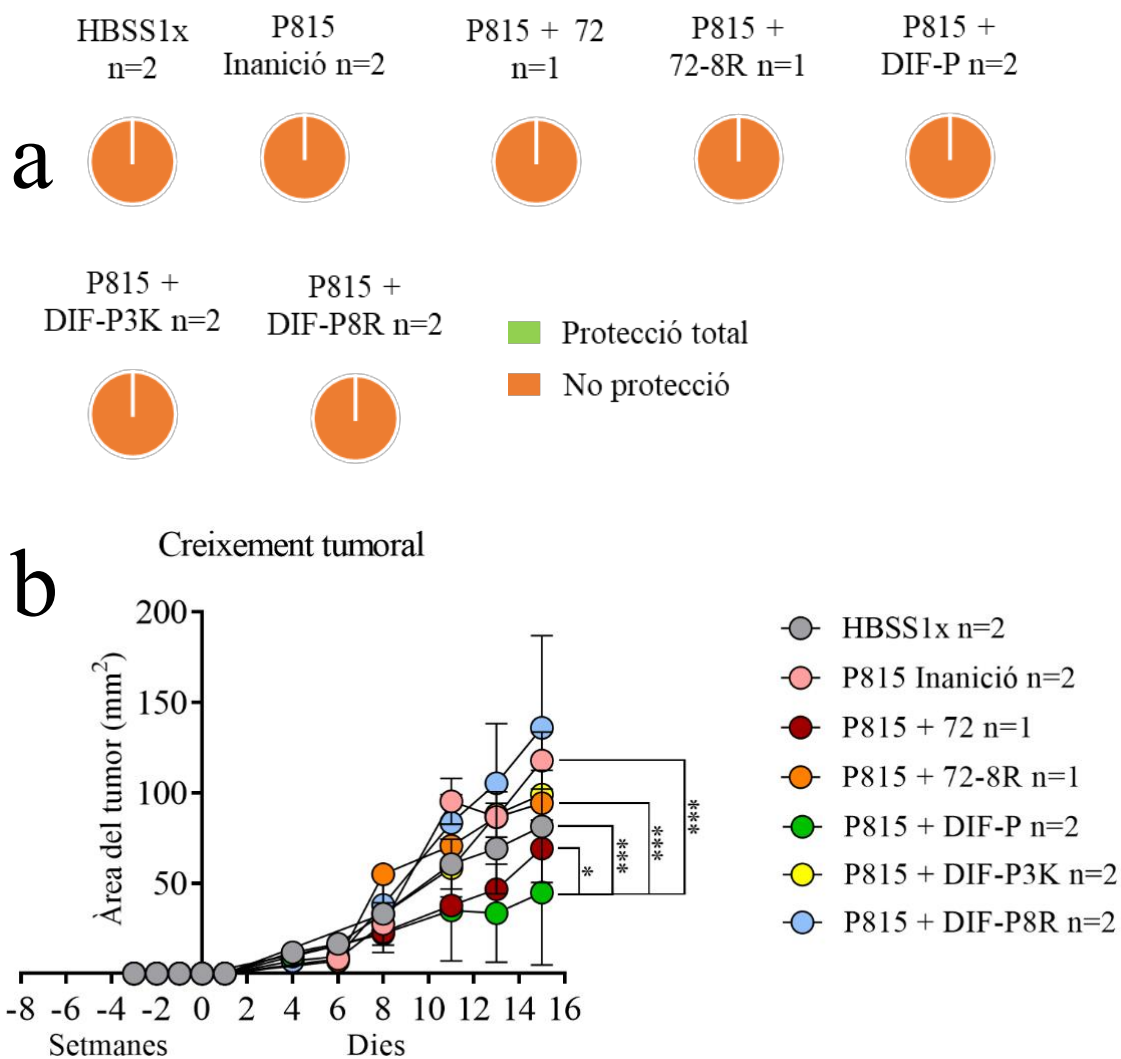


Figura 62. Experiment d'ICD amb tres immunitzacions de cèl·lules P815 incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids. (a) Protecció total vs. No protecció. (b) Seguiment del creixement tumoral.

Una sola immunització de cèl·lules P815 incubades durant una i 16 hores amb els diferents pèptids i congelació posterior

Tal i com s'ha descrit en apartats anteriors, els resultats en el model de melanoma suggerien que el temps d'incubació de les cèl·lules tumorals amb els diferents pèptids influïa en la capacitat d'aquests per protegir als ratolins enfront al desenvolupament de tumors. És per això que es van realitzar experiments *in vivo* de mort cel·lular immunogènica en que les cèl·lules es van incubar una i 16 hores amb els diferents pèptids. Com que en aquestes condicions no aconseguíem tenir més d'un 80% de mortalitat en tots els grups de vacunació, es va decidir congelar les cèl·lules a -80°C després de tractar-les amb els diferents pèptids (figura 63).

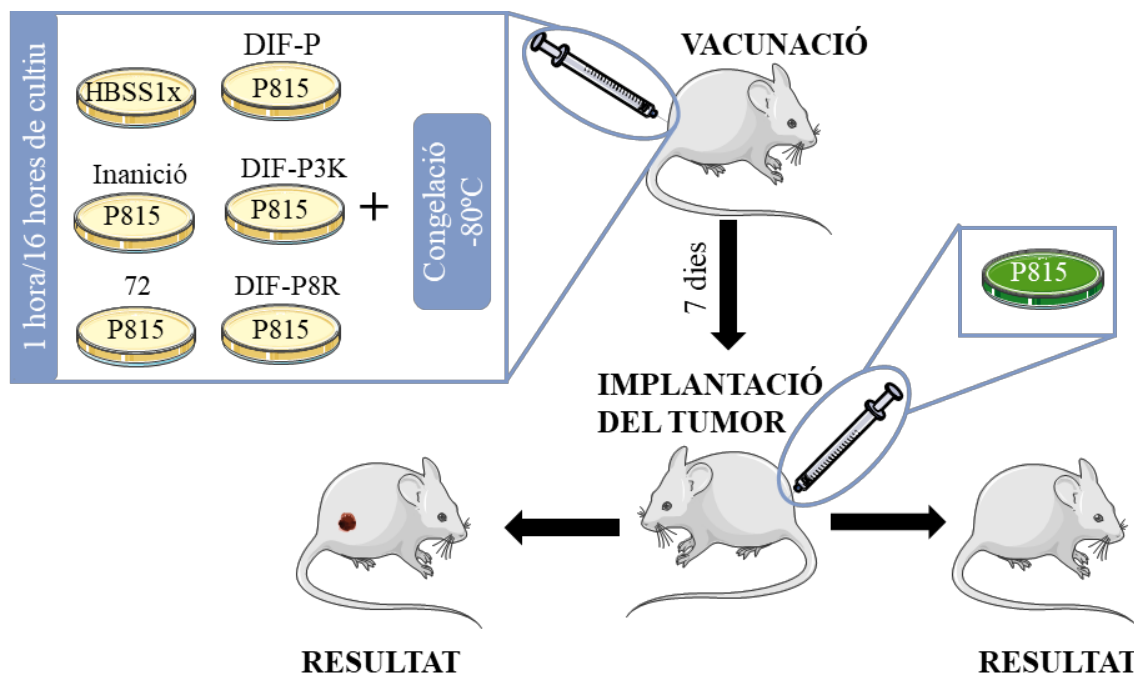


Figura 63. Disseny experimental de l'estudi d'ICD amb una sola immunització de cèl·lules P815 incubades durant una hora o 16 hores amb els diferents pèptids.

Malgrat en cap de les dues condicions es va poder observar una protecció total envers al desenvolupament del mastocitoma, sí que es va poder observar un retard en el creixement d'aquest, tal i com es mostra en la figura 64. En comparació amb els ratolins als que només se'ls va injectar HBSS 1X, aquells als que se'ls va tractar amb cèl·lules P815 incubades amb DIF-P ($p=0,03$), DIF-P3K ($p=0,01$) o DIF-P8R ($p=0,009$) durant una hora tenien un creixement tumoral més lent. Malgrat no era estadísticament significativa, en tots tres casos també es veia una tendència de creixement més lenta en comparació als altres grups control (inanició i pèptid 72). En canvi, quan es van tractar les cèl·lules P815 durant 16 hores amb els diferents estímuls, només el pèptid DIF-P presentava cert retard en el creixement tumoral respecte els controls amb HBSS 1X ($p=0,02$), cèl·lules en inanició ($p=0,07$) i cèl·lules amb el pèptid 72 ($p=0,1$). Els pèptids DIF-P3K i DIF-P8R no conferien cap mena de protecció als ratolins.

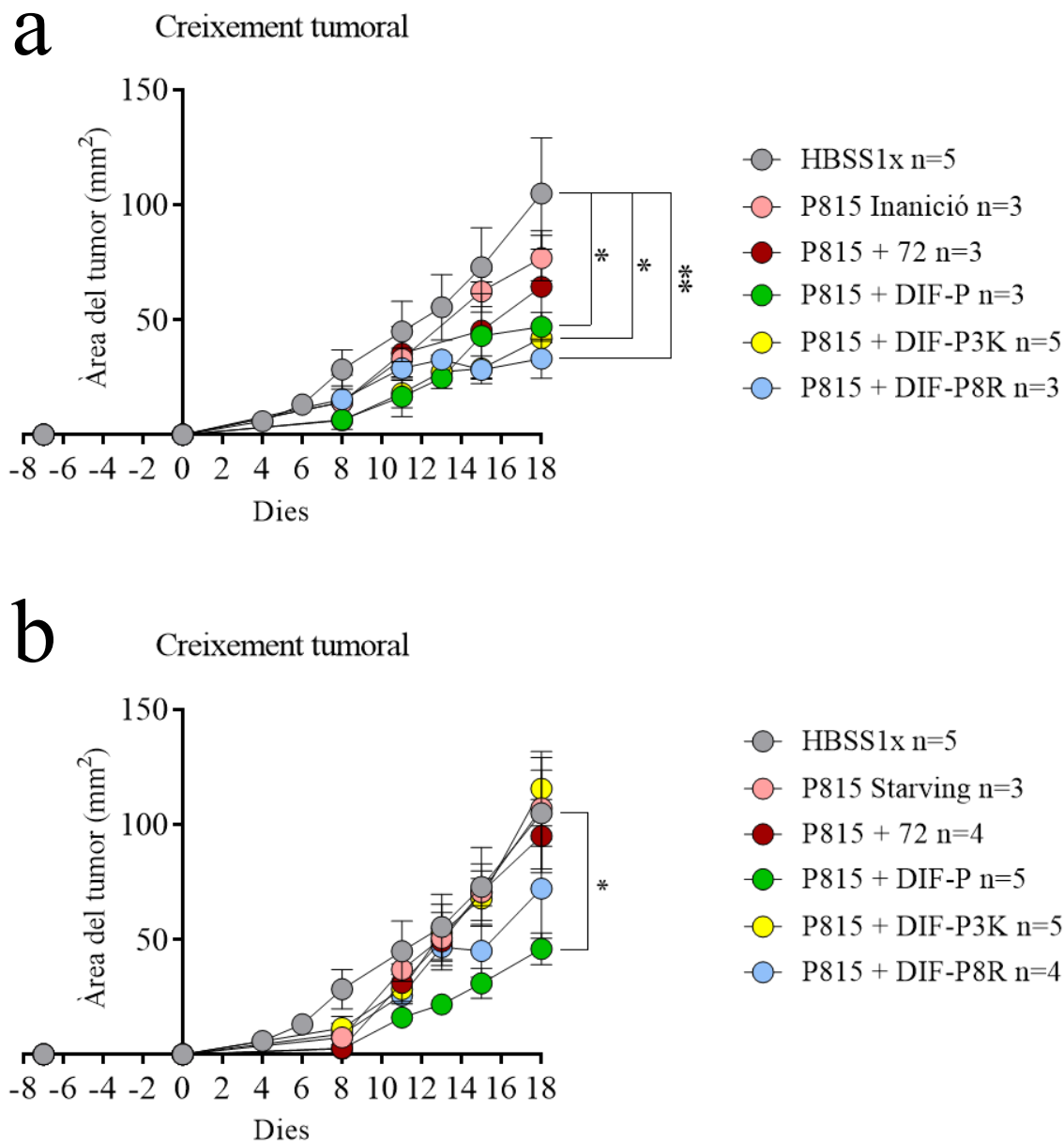


Figura 64. Experiment d'ICD amb una sola immunització de cèl·lules P815 incubades durant una hora o 16 hores amb els diferents pèptids. (a) Seguiment del creixement tumoral en els ratolins immunitzats amb P815 tractades durant una hora amb els diferents estímuls. (b) Seguiment del creixement tumoral en els ratolins immunitzats amb P815 tractades durant 16 hores amb els diferents estímuls.

Tres immunitzacions de cèl·lules incubades amb DIF-P3K durant 1 hora i congelació posterior

Malgrat no era tan clar com en els experiments amb el model de melanoma, vam veure que els resultats obtinguts en aquest model de mastocitoma també variaven en funció del temps d'incubació de les cèl·lules P815 amb els diferents pèptids. És per això que es va decidir realitzar la mateixa pauta d'administració que en el model de melanoma, augmentant el

nombre d'immunitzacions però mantenint el temps d'incubació en el qual els pèptids eren més efectius. Per tant, es va decidir realitzar 3 immunitzacions de les cèl·lules tractades amb DIF-P3K durant 1 hora i posteriorment congelades (figura 65).

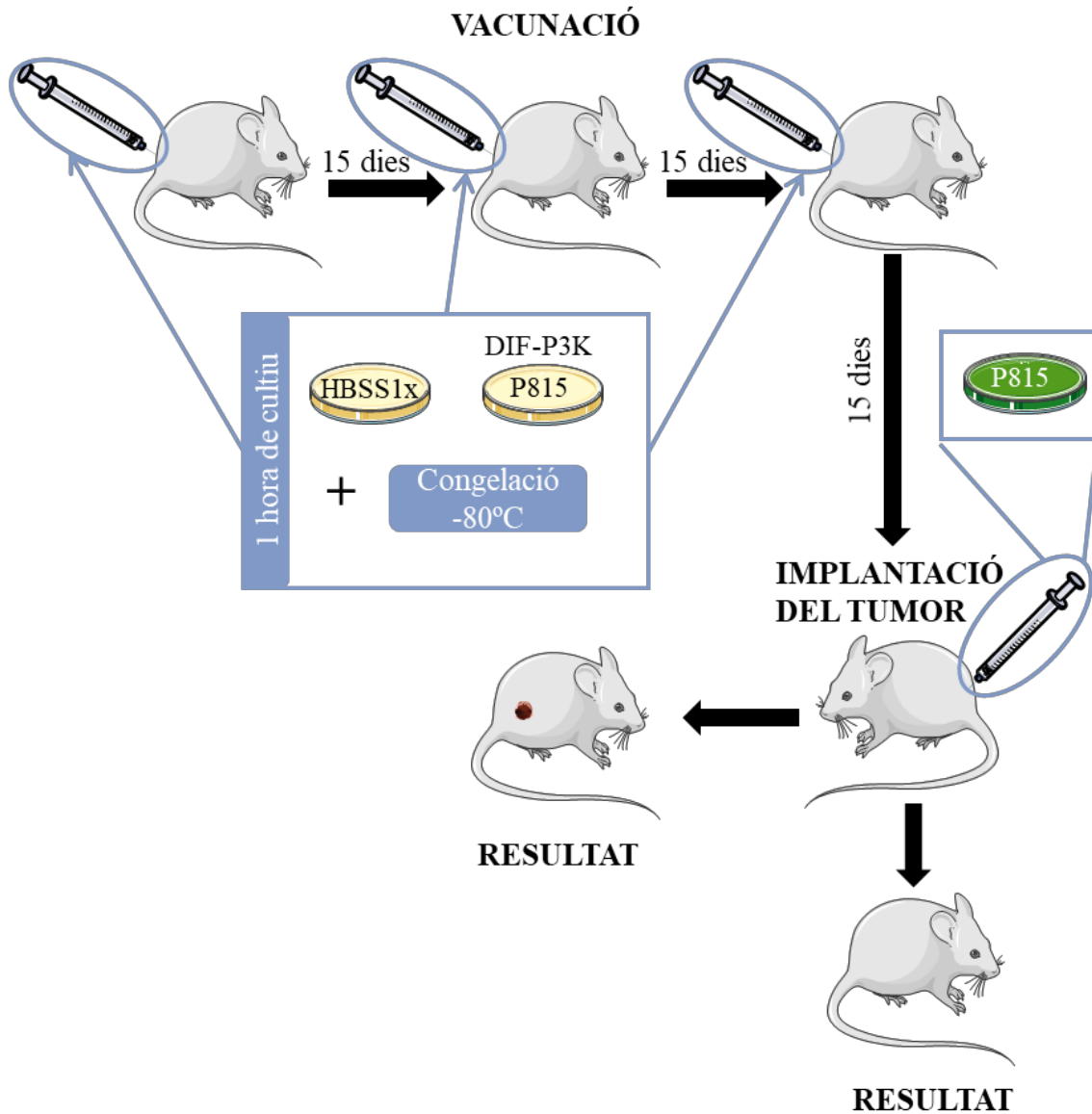


Figura 65. Disseny experimental de l'estudi d'ICD amb tres immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules P815 incubades durant 1 hora amb DIF-P3K, i posteriorment congelades.

Tal i com es mostra en la figura 66, dos dels 3 ratolins vacunats amb DIF-P3K no van desenvolupar tumor en el lloc d'implantació de les cèl·lules P815 ($p=0,03$), mentre que tots els ratolins vacunats amb HBSS 1X sí que ho van fer. A més a més, el creixement d'aquests era significativament més ràpid que el del únic ratolí vacunat amb DIF-P3K que sí que va desenvolupar tumor, suggerint que aquesta pauta de vacunació conferia una protecció parcial en aquells ratolins en que, malgrat estar vacunats, desenvolupaven un tumor.

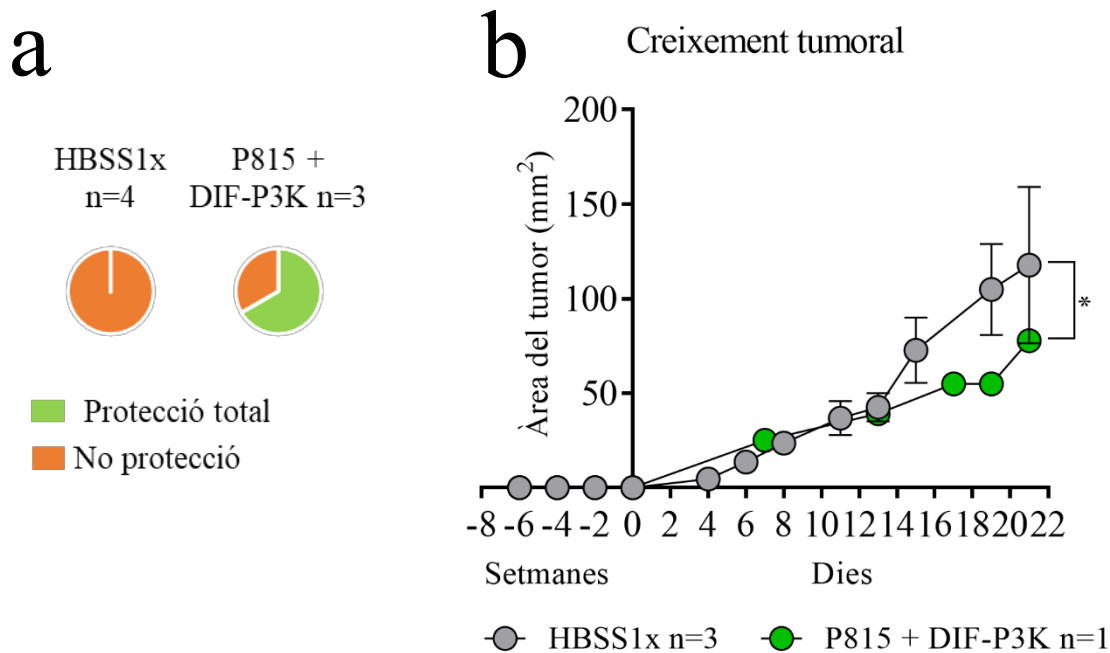


Figura 66. Experiment d'ICD amb tres immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules P815 incubades durant 1 hora amb DIF-P3K, i posteriorment congelades. (a) Protecció total vs. No protecció. (b) Seguiment del creixement tumoral.

Tres immunitzacions de cèl·lules incubades amb DIF-P8R durant 16 hores i congelació posterior

De la mateixa manera que amb DIF-P3K, es va realitzar la mateixa pauta d'immunització que en el model de melanoma amb el pèptid DIF-P8R. En aquests cas, es van fer 3 immunitzacions amb les cèl·lules cultivades 16 hores amb DIF-P8R i posteriorment congelades (figura 67). Tal i com es mostra en la figura 68, cap dels ratolins vacunats amb DIF-P8R va desenvolupar tumor en el lloc d'implantació de les cèl·lules P815. Malgrat caldria augmentar el nombre d'individus del grup tractat amb DIF-P8R, els resultats suggerien que la vacunació amb aquest podria protegir als ratolins de desenvolupar un tumor tipus mastocitoma.

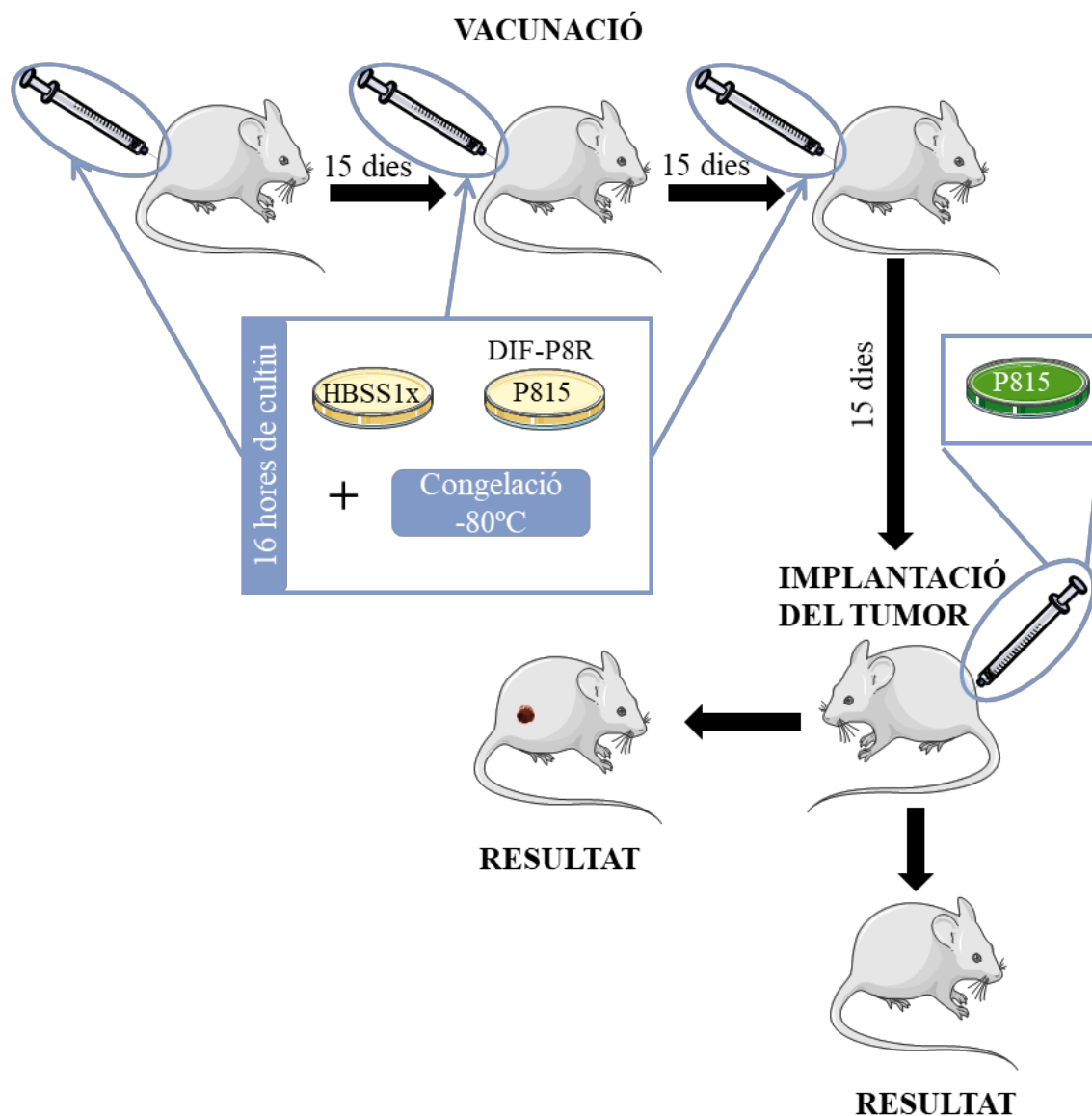


Figura 67. Disseny experimental de l'estudi d'ICD amb tres immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules P815 incubades durant 16 hores amb DIF-P8R, i posteriorment congelades.

Degut a la dificultat de cria de la soca P815, en aquest cas només es van poder incloure 2 ratolins en l'estudi. De la mateixa manera, es va voler tractar als ratolins amb 6 immunitzacions amb les cèl·lules tractades amb DIF-P durant 24 hores i posteriorment congelades, així com amb 3 immunitzacions diferents, cadascuna d'elles amb un pèptid, separades entre si per 15 dies. En ambdós casos només es va poder realitzar l'estudi amb un sol ratolí, és per això que no s'inclouen els resultats en aquesta tesi, malgrat aquests són molt prometedors. El ratolí vacunat amb les cèl·lules tractades amb DIF-P presentava un creixement tumoral més lent que el dels ratolins control i el ratolí vacunat amb DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R, presentava una protecció total enfront al desenvolupament de mastocitoma P815.

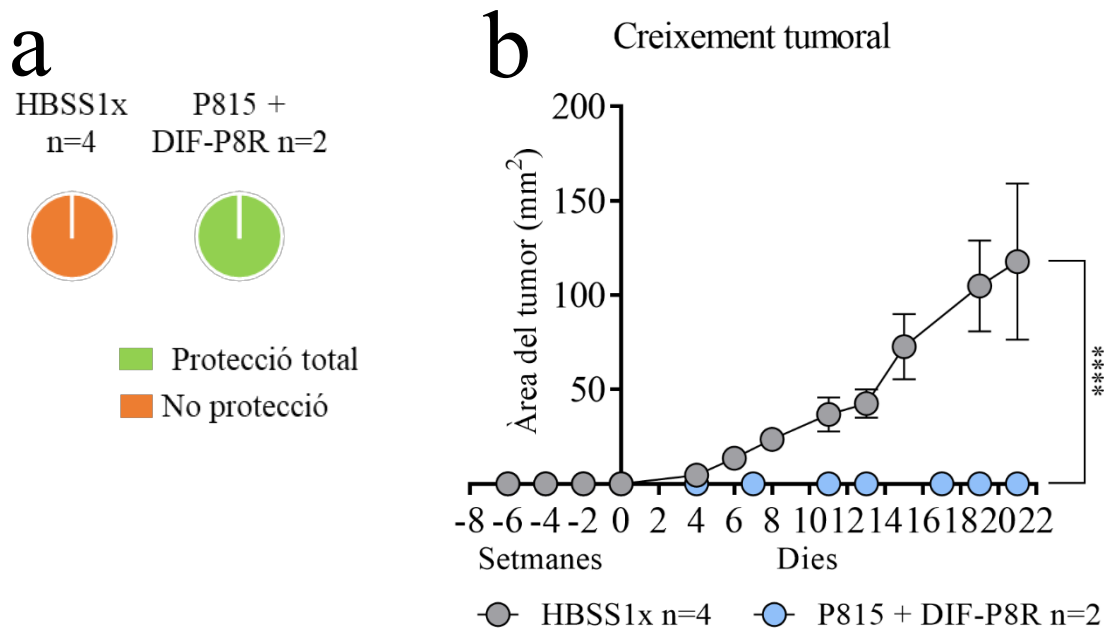


Figura 68. Experiment d'ICD amb tres immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules B16-F10 incubades durant 16 hores amb DIF-P8R, i posteriorment congelades. (a) Protecció total vs. No protecció. (b) Seguiment del creixement tumoral.

2.3.3. DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R com a teràpies contra el càncer

2.3.3.1. Tractament mitjançant injeccions intratumorals dels pèptids

Tal i com es va demostrar en els experiments *in vitro*, DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R són citotòxics per a totes les línies cel·lulars analitzades fins al moment, entre ells les línies tumorals murines utilitzades en aquest estudi: la línia de mastocitoma P815 i la línia de melanoma B16-F10.

Per tal de fer una primera aproximació de l'ús dels pèptids DIF com a agents immunoteràpics sense la necessitat d'utilitzar cèl·lules tumorals com a vacuna, es va fer una prova preliminar amb el pèptid DIF-P3K. Es va escollir aquest pèptid degut a que s'havia observat *in vitro* que era capaç d'induir una elevada mortalitat de les cèl·lules i que alhora, segons els estudis previs del nostre laboratori²¹⁶, era capaç d'induir una resposta immunitària en monòcits murins. Per fer-ho, primerament es va generar un tumor en els ratolins DBA/2N mitjançant una injecció intradèrmica de les cèl·lules P815. Un cop el tumor va ser d'aproximadament 50 mm², es va injectar directament a l'interior del tumor el pèptid DIF-P3K a una concentració de 55 µM i es va fer un seguiment del tumor durant 1 setmana. Al ratolí control se li va injectar HBSS 1X.



Figura 69. Seguiment després de la punció intratumoral. (a) Control HBSS 1X. (b) Mascle DIF-P3K. (c) Femella DIF-P3K.

Mentre que en el ratolí control el creixement tumoral va seguir el seu curs natural (figura 69a), la injecció del pèptid DIF-P3K en la massa tumoral va generar una necrosi clara en aquesta en ambdós ratolins testats, la qual es podia començar a observar-se tan sols 24 hores després de la injecció. Aquesta necrosi va ésser major amb els pas dels dies. En un dels casos, la massa tumoral va reduir-se de manera molt marcada fins als 6 dies posteriors a la injecció (figura 69b). En l'altre ratolí en canvi, malgrat reduir-se clarament el tumor durant els primers dies, es va observar el creixement tumoral de nou a partir de les 72 hores al voltant de la part necrosada (figura 69c).

Després d'aquests resultats tan prometedors, es va voler veure si es podia generar un efecte similar en el model de melanoma, el qual té molt més interès a nivell clínic. En aquest cas, a banda del pèptid DIF-P3K, es van testar també els pèptids DIF-P i DIF-P8R.

Tal i com es mostra en la figura 70, els tumors dels ratolins tractats només amb HBSS 1X van créixer molt ràpidament, augmentant la seva àrea fins a 4 vegades en només 3 dies. En canvi, en els ratolins tractats amb els pèptids derivats de la periferina aquest creixement va resultar ser més lent. Malgrat les diferències només van ser significatives en el cas dels ratolins tractats amb DIF-P3K ($p=0,01$), els resultats també van suggerir que DIF-P i, en menor mesura, DIF-P8R també aturaven el creixement tumoral.

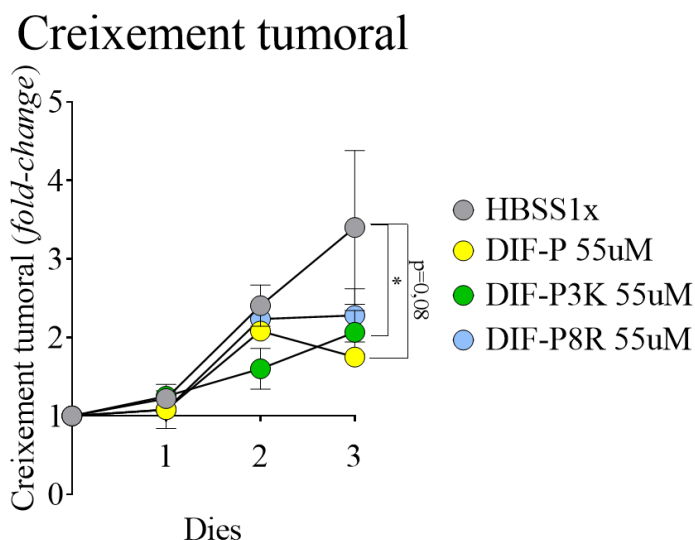


Figura 70. Evolució dels tumors B16-F10 després de la injecció intratumoral (dia 0) dels diferents pèptids a una concentració de 55 μ M. n=2.

2.3.3.2. Tractament mitjançant la injecció dels pèptids a nivell sistèmic

Un dels principals problemes en els tractaments anti-tumorals és la pobra penetració de les drogues anti-cancerígenes en el parènquima del tumor, la qual cosa fa que aquests tractaments tinguin una baixa eficàcia terapèutica així com diversos efectes adversos. En els darrers anys, s'ha vist que un pèptid penetrant a tumor o TPP anomenat iRGD es pot utilitzar de manera eficaç per a alliberar els fàrmacs en els tumors. Aquest s'uneix a través del seu motiu RGD (seqüència Arg-Gly-Asp) a les integrines αv , les quals es troben molt expressades en la vasculatura dels tumors. És per això que, en el present estudi, es van generar dos constructes formats per els pèptids DIF-P3K i iRGD. Un dels constructes presentava el pèptid iRGD en forma cíclica, mentre que l'altre estava en estat lineal. A més a més, aquest constructe es va marcar amb un fluorocrom de manera que vam poder determinar que ambdós constructes es localitzaven i concentraven en el tumor pocs minuts després de la seva injecció sistèmica (figura 71). D'aquesta manera, seriem capaços no només de tractar els tumors accessibles mitjançant la punció intratumoral dels pèptids sinó que també es podrien tractar aquells tumors no accessibles mitjançant l'administració d'aquest constructe. Primerament es va generar un tumor en els ratolins C57BL/6 mitjançant una injecció intradèrmica de les cèl·lules B16-F10. Un cop el tumor va ser d'aproximadament 50 mm^2 , es van injectar per via intravenosa retroorbital els pèptids iRGD.DIF-P3K a una concentració de 55 μ M. Aquesta injecció es va repetir durant 7 dies,

administrant els pèptids cada 24 hores. Als ratolins control se'ls va injectar HBSS 1X, seguint la mateixa pauta d'administració.

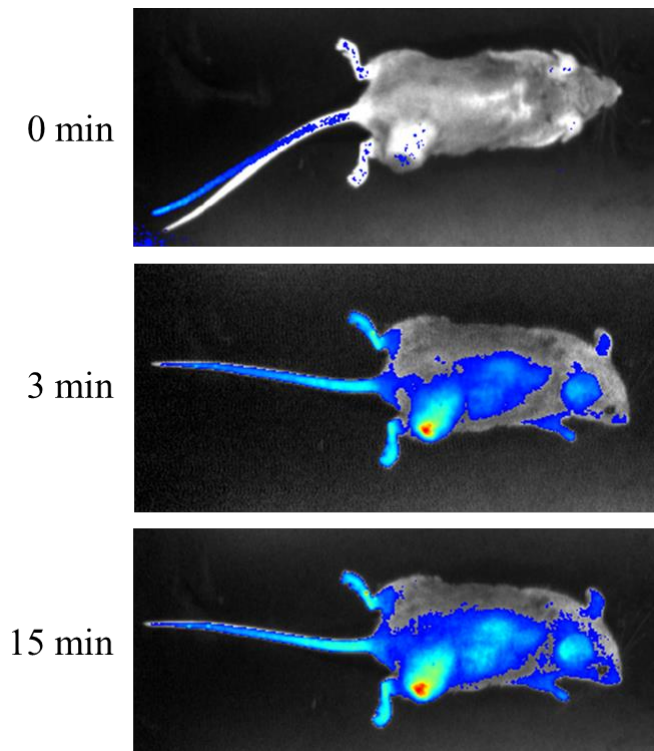


Figura 71. Imatge representativa de la localització del pèptid iRGD-DIF-P3K en el tumor després de la seva injecció sistèmica. Tant la forma cíclica com la lineal del pèptid eren capaces de dirigir DIF-P3K al tumor pocs minuts després de la seva injecció sistèmica.

Tal i com es mostra en la figura 72, el creixement tumoral es va retardar en els ratolins que havien estat tractats amb qualsevol dels pèptids iRGD.DIF-P3K en comparació amb els que no havien rebut tractament. Mentre que els primers augmentaven entre 2 i 3,8 vegades la seva àrea inicial al final del tractament, els últims ho feien fins a més de 5 vegades. Passats dos dies de la última injecció, els ratolins control tenien tumors fins a 8,5 vegades més grans que el tumor inicial, mentre que els dels ratolins tractats amb els pèptids iRGD.DIF-P3K lineal i iRGD.DIF-P3K cíclic només havien augmentat la seva àrea entre 3,7 i 6,2 vegades, respectivament. Malgrat que les diferències eren estadísticament significatives en els 2 constructes, el retard en el creixement tumoral era més evident en els ratolins que s'havien tractat amb la forma lineal del pèptid ($p < 0,0001$) que en els que s'havien tractat amb la forma cíclica ($p = 0,015$). A més a més, un dels ratolins al que se li havia administrat el pèptid iRGD.DIF-P3K lineal, va presentar una necrosi clara en la part central del tumor.

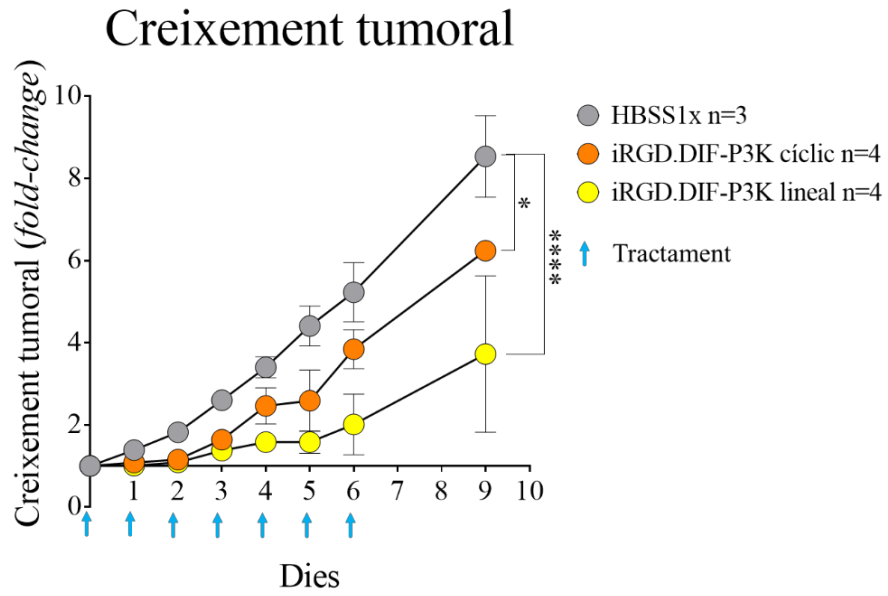


Figura 72. Tractament dirigit dels tumors B16-F10 amb DIF-P3K-iRGD. Els diferents ratolins es van tractar durant 7 dies amb una injecció intravenosa retroorbital dels diferents pèptids a 55 μ M cada 24 hores.

DISCUSSION

1. Estudi de la implicació del Sistema Nerviós en el desenvolupament de la Diabetis Tipus 1

La Diabetis Tipus 1 és una malaltia autoimmunitària crònica que es caracteritza per una hiperglucèmia causada per una destrucció mitjançada pel sistema immunitari de les cèl·lules β pancreàtiques productores d'insulina. Malgrat s'han pogut identificar molts dels autoantígens diana d'aquest atac autoimmunitari, els mecanismes pels quals aquests es generen encara no han estat dilucidats. Alguns estudis donen suport a la hipòtesi que les neurones sensorials aferents estan implicades en la patogènesi de la T1D, ja que les neurones que envolten els illots pancreàtics també pateixen l'atac dels limfòcits autoreactius^{132,142,221}. Es dona, per tant, un atac simultani a les cèl·lules β i al Sistema Nerviós Perifèric (SNP) que regula l'activitat dels illots pancreàtics.

Estudis previs del nostre laboratori, van demostrar que algunes neurones dels DRG de ratolins NOD presenten vacuoles en el seu citoplasma. Aquestes alteracions es mantien constants a diferents edats i es podien observar en ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-} però no en ratolins C57BL/6, la qual cosa feia pensar que es tractava de quelcom intrínsec de la soca NOD i que no era derivat d'una resposta autoimmunitària. Diversos estudis han relacionat l'acumulació de lisosomes i vacúols autofàgics al citoplasma amb l'aparició de diferents malalties neurodegeneratives, com l'Alzheimer²²², el Parkinson²²³, Huntington²²⁴ i l'Esclerosi Lateral Amiotròfica²²⁵, entre d'altres²²⁶. Les vacuoles observades en els ratolins NOD, però, presentaven una única membrana, la qual cosa descartava la hipòtesi d'un procés autofàgic, en el qual hi hauria d'haver vesícules de doble membrana. Aquest tipus d'alteracions poden ser degudes a l'excitotoxicitat²⁰⁹, un fenomen que també és característic d'alguns processos neurodegeneratius. A més a més, aquestes alteracions s'han vist en un altre model de T1D espontània, les rates BB diabètiques. S'ha postulat que pot ser causat per un deteriorament de la síntesi de proteïnes del citoesquelet²⁰⁷.

En el present treball, es va realitzar un anàlisi de l'expressió genètica de les cèl·lules dels DRG per tal d'intentar demostrar la hipòtesi que la T1D podria derivar-se d'un procés neurodegeneratiu, el qual provocaria un alliberament d'autoantígens que podria ser el causant de la resposta autoimmunitària contra el SNP però també contra les cèl·lules β . Es va realitzar un anàlisi de l'expressió d'ARNm per tal de determinar les possibles causes i/o molècules implicades en aquest suposat procés neurodegeneratiu. A més a més, es van seleccionar 5 dels gens identificats com a diferencialment expressats entre els ratolins

C57BL/6 i els ratolins NOD (i NOD.Rag2^{-/-}) per tal de validar els resultats mitjançant un anàlisi per RT-qPCR.

Els resultats dels microarrays suggereixen que les cèl·lules dels DRG dels ratolins NOD presenten un perfil d'expressió diferent a les dels ratolins C57BL/6. Això confirma que existeix una disrupció funcional en aquestes cèl·lules, la qual podria estar relacionada amb l'aparició i el desenvolupament de la T1D. D'entre tota la gamma de processos biològics que semblaven estar alterats en els ratolins NOD, en els microarrays es va poder observar una possible alteració en el metabolisme proteic, ja que es va detectar un patró d'expressió alterat de proteïnes ribosomals així com proteolítiques. Per tant, tant la síntesi com la degradació de les proteïnes es trobaven alterades. També es va poder detectar una alteració en l'expressió de gens implicats en l'homeòstasi d'alguns ions. Un d'ells és el canal Tmem203, el qual està implicat en la regulació de l'homeòstasi del calci²²⁷. La seva expressió estava regulada positivament en ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-}, la qual cosa promouria una reducció dels nivells de Ca²⁺ al reticle endoplasmàtic. El calci és un ió necessari per al correcte plegament de les proteïnes, de manera que quan està alterada la seva homeòstasi, el plegament pot ser defectuós. A més a més, en aquests ratolins també es van trobar regulades a la baixa algunes xaperones com la Hsp1, cosa que corroboraria la hipòtesi d'un plegament incorrecte de proteïnes. Aquestes podrien acumular-se i causar estrès en el RE. Per tal d'intentar reduir aquest estrès, les cèl·lules compten amb diversos mecanismes, com la resposta a proteïnes desplegadas o UPR (de l'anglès, *Unfolded Protein Response*). Es tracta d'una resposta adaptativa altament conservada a nivell evolutiu, que respon a l'estrès del RE aturant la traducció de proteïnes així com activant vies de senyalització que promouen l'expressió de xaperones que ajuden al correcte plegament de les proteïnes mal plegades o bé faciliten la degradació d'aquestes^{228,229}. S'ha descrit que alteracions en l'homeòstasi del RE podrien contribuir a la disfunció de les cèl·lules β i, conseqüentment, a l'aparició de diabetis tipus 1²³⁰. Una altra via d'alliberament de l'estrès provocat per les proteïnes mal plegades és la via UBL (de l'anglès, *Ubiquitin Ligation Pathway*). Es tracta d'una via de degradació de proteïnes que implica 2 passos successius: 1) etiquetar la proteïna mitjançant la unió covalent de múltiples molècules d'ubiquitina (Ub), i 2) la degradació de la proteïna marcada per la subunitat 26 del proteasoma²³¹. Aquesta funció clàssica de la Ub es relaciona amb funcions *housekeeping*, regulació del recanvi (*turnover*) de proteïnes i la generació de pèptids antigènics. La *Valosin Containing Protein* o Vcp, la qual es troba expressada a la baixa en els DRGs de ratolins NOD i

NOD.Rag2^{-/-}, és una ATPasa implicada en la degradació de molècules conjugades a Ub^{231,232}. Això suggereix que aquests ratolins podrien tenir una degradació deficient de les proteïnes ubiquitinligades. A més a més, aquests ratolins també presenten una *down-regulació* del gen Mid1 (*Midline 1*), una E3 Ubiquitin lligasa que també està implicada en aquesta via UBL^{233,234}.

En condicions normals, les cèl·lules β pateixen nivells d'estrès de RE fisiològicament elevats. Tot i així, alguns estudis han demostrat que mutacions en gens crítics per a la funció del RE poden donar lloc a una disfunció de les cèl·lules β i, conseqüentment, a l'aparició de T1D²³⁰. En conjunt, els nostres resultats del microarray suggereixen que les cèl·lules dels DRGs de ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-} pateixen estrès de reticle, evidenciant que aquest no és només un problema existent a les cèl·lules β , sinó que també es troba en les cèl·lules del SNP, l'altre objectiu conegut de la T1D. L'origen d'aquest estrès és desconegut, però podria estar relacionat amb una alteració de l'homeòstasi del calci, la qual causaria una disfunció de les xaperones del RE i, en conseqüència, l'acumulació de proteïnes mal plegades en aquest compartiment. A més a més, els nostres resultats suggereixen que les cèl·lules dels DRG de ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-} presenten alteracions en la via UBL, la qual cosa faria que les proteïnes mal plegades no es poguessin degradar i es seguirien acumulant. Aquest procés podria facilitar la presentació d'autoantígens en un context d'estrès i inflamació. Aquesta hipòtesi es veuria reforçada pels resultats dels microarrays, on es va observar una baixa expressió de Rps12 i Vcp. A més a més, els resultats per RT-qPCR van mostrar una baixa expressió de Vcp tant en les cèl·lules dels DRGs com en leucòcits de sang perifèrica. La proteïna Rps12, en canvi, no mostrava diferències entre soques a nivell del SNP, però sí a nivell de sang perifèrica. Rps12 té funcions reguladores importants en el ribosoma i ajuda a mantenir un ritme normal de síntesi de proteïnes. La Vcp, en canvi, és una proteïna multifunció. Una de les seves principals funcions, però, és la de participar en la degradació de proteïnes mal plegades a través de la via UBL. Tot i així, serien necessaris més experiments per tal de dilucidar la funció específica de cada una de les proteïnes identificades en el context del desenvolupament de la diabetis autoimmunitària. A més a més, també caldria realitzar més experiments per a definir si l'estrès del RE i el defecte en la UPR són el desencadenant inicial de la resposta autoimmunitària enfront les cèl·lules β o bé si només es tracta d'una conseqüència de la inflamació crònica que es dona en la T1D.

D'altra banda, alguns estudis han descrit la presència d'alteracions en les neurones sensorials TRPV1⁺ de ratolins NOD, de manera que s'inhibeix la seva activació i l'alliberament de neuropèptid als illots pancreàtics¹⁴². A més a més, el gen *Trpv1* es localitza en un locus de susceptibilitat a T1D en els ratolins NOD (Idd4.1). També s'han descrit mutacions en aquest gen que estan relacionades amb la susceptibilitat de desenvolupar T1D en humans. Arl8a és una GTPasa implicada en la correcta segregació dels cromosomes durant la divisió cel·lular, de manera que la reducció de la seva activitat induïx una morfologia anormal en la segregació dels cromosomes²³⁵. Recentment, però, s'ha demostrat a través d'espectrofotometria de masses que Arl8a pot interaccionar amb els receptors TRPV1²³⁶, la qual cosa fa pensar en un paper desconegut d'aquesta proteïna. Malgrat els nostres resultats no són del tot clars, semblen indicar que la GTPasa Arl8a es troba sobre-expressada tant en les cèl·lules dels DRGs com en els leucòcits de ratolins NOD, la qual cosa recolza la teoria d'aquest nou paper en la senyalització a través dels receptors TRPV1 en les cèl·lules dels DRGs.

La secretogranina V o Scg5 (també coneguda com proteïna neuroendocrina 7B2) és una xaperona de la pro-proteïna convertasa 2 o PC2. La PC2, juntament amb la PC1 i la PC3, està implicada en el processament de pro-hormones i pro-neuropèptids. La proteïna Scg5 també ajuda en el transport de la PC2 des del RE fins a compartiments més tardans de la via de secreció²³⁷⁻²⁴⁰. Segons els nostres estudis, la Scg5 es troba sobre-expressada en les cèl·lules dels DRGs dels ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-}, la qual cosa suggereix que aquestes presenten un processament de neuropèptids i una senyalització alterats. A més a més, l'expressió d'aquesta proteïna era més elevada en els leucòcits d'aquells ratolins amb susceptibilitat a autoimmunitat (NOD, FVB i SJL). En el mateix sentit, els nivells de proteïna en sang de pacients diabètics també eren més elevats que en els pacients control. En conjunt, els nostres resultats fan pensar en un nou paper de la Scg5 en la resposta autoimmunitària característica de la T1D i avalen la hipòtesi que existeix una relació entre la degeneració neuronal i l'aparició de T1D. Existeix una complexa relació entre el sistema nerviós i el sistema immunitari a través de l'acció de neurotransmissors. De fet, s'ha descrit que, en les etapes més primerenques de la malaltia, existeix una resposta autoimmunitària contra antígens neuroendocrins^{131,241}. Un clar exemple és la presència de limfòcits autoreactius contra GFAP en ratolins abans de les 3 setmanes d'edat²⁴². Per tant, seria possible que alteracions a nivell neuronal exposessin autoantígens que, en condicions fisiològiques, no serien visibles per al sistema immunitari. Això afavoriria una resposta

autoimmunitària en aquells individus susceptibles de desenvolupar T1D. Tot i així, caldria fer més estudis per tal de comprendre completament el paper d'aquesta neurodegeneració en el desenvolupament de la T1D.

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, per tal de validar els resultats obtinguts en els microarrays, es va realitzar un anàlisi per RT-qPCR de l'expressió de 5 dels gens que s'havien identificat com a diferencialment expressats entre els ratolins C57BL/6 i els ratolins NOD. Tal i com es descriu en l'apartat dels *Resultats*, no tots els resultats de RT-qPCR corroboren els nivells d'expressió detectats en els microarrays. De fet, només dos dels cinc gens seleccionats tenen el mateix patró d'expressió en ambdós estudis. Els altres gens no mostren diferències significatives d'expressió entre els grups de ratolins per RT-qPCR i el gen *Ahcy*, fins i tot, mostra un comportament oposat en els dos assajos. Tot i així, aquest estudi ens va permetre detectar que la transcripció dels gens *Scg5* i *Vcp* es trobava augmentada i reduïda, respectivament, en les cèl·lules dels DRG dels ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-} en comparació amb els ratolins C57BL/6. Això es va poder confirmar mitjançant dos assaigs diferents, la qual cosa indica que podrien ser bons candidats per a la investigació en T1D. A més a més, tot i que els nivells d'expressió del gen *Ahcy* en els DRGs no eren els esperats en l'assaig per RT-qPCR, aquests eren diferents entre les diverses soques de ratolí. Ja sigui perquè la seva transcripció estava alterada positiva o negativament, *Ahcy* es trobava diferencialment expressat en ratolins amb susceptibilitat a desenvolupar T1D, la qual cosa el podria convertir també en un bon gen candidat per a la investigació en T1D. D'altra banda, vam detectar que els nivells d'expressió dels gens *Ahcy* i *Vcp* en leucòcits de sang perifèrica de ratolins NOD són més baixos que en la majoria de les altres soques estudiades, mentre que el gen *Arl8a* s'expressa de manera més alta en els ratolins NOD que en la majoria de les altres soques. A més a més, el gen *Scg5* s'expressava més en els leucòcits d'aquells ratolins amb susceptibilitat a autoimmunitat (NOD, FVB i SJL). Totes aquestes diferències podien ser detectades amb una simple anàlisi a nivell de sang perifèrica, la qual cosa fa pensar que algun d'aquests gens podria ser determinant de l'autoimmunitat que deriva a l'aparició de T1D.

En conjunt, els nostres resultats suggereixen l'existència d'un defecte degeneratiu a les neurones sensorials dels DRGs, la qual cosa dóna suport a la hipòtesi d'una disfunció del SNP en la T1D. Aquesta, podria predisposar a les cèl·lules dels DRGs a ser atacades pel sistema immunitari. A més a més, algunes de les alteracions observades en els DRGs de ratolins NOD també s'han pogut observar en leucòcits de sang perifèrica. Aquests resultats

són molt interessants degut a la impossibilitat d'accedir als DRGs *in vivo*, ja que l'anàlisi de la seva expressió en leucòcits de sang perifèrica podria ser una forma ràpida i senzilla de detectar els individus susceptibles a desenvolupar T1D abans de l'aparició d'aquesta. En aquesta direcció, es van realitzar estudis amb mostres de sang perifèrica de pacients diabètics. En les mostres humanes només es van trobar diferències estadísticament significatives en l'expressió de la *Valosin Containing Protein*. Tot i que els resultats en sang perifèrica de ratolins indicaven que aquesta s'expressa menys en els ratolins amb susceptibilitat a autoimmunitat, els resultats en humans semblen indicar que els pacients diabètics presenten una major expressió de *Vcp* en comparació amb els pacients control. De totes maneres, ja sigui perquè s'expressa més o menys, sembla que la *Vcp* podria tenir un paper important en el desenvolupament de la malaltia i podria esdevenir un bon biomarcador de susceptibilitat a patir diabetis. D'altra banda, malgrat les diferències en el nivell de proteïna *Scg5* en sang no eren estadísticament significatives, sí que es va observar una tendència a una major expressió d'aquesta en dones diabètiques. Caldria realitzar més estudis per acabar de determinar si aquesta proteïna podria ser utilitzada com a marcador de susceptibilitat a T1D, al menys en dones. La resta de gens analitzats no mostraven diferències estadísticament significatives, segurament degut a la gran desviació en els resultats. Cal tenir en compte que els estudis en mostres humanes es van realitzar en pacients diabètics i no en pacients susceptibles a desenvolupar la malaltia, la qual cosa podria explicar algunes de les diferències amb els resultats en ratolins.

En resum, els nostres resultats avalen la hipòtesi que la diabetis tipus 1 no és una malaltia que només afecta a les cèl·lules β del pàncrees, sinó que es tracta d'una malaltia multisistèmica. Entre el conjunt de cèl·lules afectades per l'atac autoimmunitari característic de la malaltia s'hi podrien trobar també les cèl·lules dels DRGs les quals, d'acord amb els resultats obtinguts en el present treball, presenten un conjunt d'alteracions en l'expressió de diverses proteïnes que podrien acabar generant autoantígens presents tant en el SNP com en les cèl·lules β pancreàtiques. D'acord amb els nostres resultats, seria possible que alteracions a nivell neuronal exposessin autoantígens que, en condicions fisiològiques, no serien visibles per al sistema immunitari, afavorint una resposta autoimmunitària en aquells individus susceptibles de desenvolupar T1D. A més a més, algunes d'aquestes alteracions genètiques poden observar-se també en leucòcits de sang perifèrica, de manera que es podria utilitzar com a biomarcador de susceptibilitat a desenvolupar la malaltia. Tot i així, caldria fer més estudis per tal de comprendre

completament el paper d'aquesta neurodegeneració en el desenvolupament de la T1D així com per determinar quin o quins gens podrien ser utilitzats com a biomarcadors per a detectar pacients susceptibles a desenvolupar diabetis tipus 1.

2. Estudi de la capacitat citotòxica i immunoestimuladora dels pèptids derivats de la Periferina

En el nostre laboratori, durant el transcurs de l'estudi de la periferina com a autoantigen en la T1D, es va veure que un dels pèptids (DIF-P) d'una llibreria peptídica d'aquesta molècula, era capaç d'estimular la producció de citocines proinflamatòries per part dels monòcits així com d'induir la mort en diversos tipus cel·lulars, tant murins com humans²¹⁶. Això va obrir una nova perspectiva pel que fa a la funcionalitat de la periferina i, més concretament, pel que fa a DIF-P, suggerint la seva participació en l'estimulació de la immunitat així com a inductor de mort cel·lular. A més a més, es va veure que aquestes propietats es trobaven amplificades i/o reduïdes quan es modificava el pèptid amb una cua de 3 lisines (DIF-P3K) o de 8 arginines (DIF-P8R). Així doncs, malgrat la producció de citocines proinflamatòries era menor, els pèptids DIF-P3K i DIF-P8R induïen major mort cel·lular, probablement degut a que aquestes cues d'aminoàcids els converteixen en CPPs i permeten la seva millor internalització. A més a més, els resultats dels diversos estudis realitzats en el present treball, suggereixen que l'activitat pro-apoptòtica és dependent de dosi. Malgrat caldria fer més experiments per determinar la capacitat proinflamatòria dels pèptids quan es troben a concentracions menors, els resultats fan pensar que al induir una menor mort cel·lular, DIF-P3K i DIF-P8R activarien aquesta capacitat en monòcits.

Tots els filaments intermedis (FI) tenen una estructura similar formada per tres parts: el cap, el centre i la cua. Les principals diferències entre grups es troben en el cap i la cua, les parts variables dels FI, mentre que la part central està molt més conservada. És per aquesta part central per on els FI s'uneixen entre ells per a formar heterodímers²²⁰. Com que el pèptid DIF-P forma part de la seqüència de la Coil 2B de la periferina, es va voler analitzar l'efecte apoptòtic de la seqüència amb la qual interacciona per a formar els dímers de periferina. Aquesta la contenen els pèptids del 20 al 30 de la llibreria peptídica de la periferina. Malgrat aquests pèptids no contenen la seqüència consens descrita anteriorment, eren capaços d'induir cert grau d'apoptosi en les cèl·lules NALM-6 transcorregudes 24 hores, però no durant la primera hora de cultiu. Això fa pensar que, tant

DIF-P com la seqüència que interacciona amb aquest podrien intercalar-se en la zona d'unió dels heterodímers dels FI i desestabilitzar la seva unió, la qual cosa promouria una alteració del citoesquelet de les cèl·lules i, finalment, la mort d'aquestes. Estudis previs del nostre laboratori, van demostrar que tant DIF-P com DIF-P8R interaccionen, a nivell citoplasmàtic, amb diversos filaments intermedis així com amb la *Heat Shock Protein 71KDa* o HSP70²¹⁶. La HSP70 és una xaperona essencial en el control de la balança entre la proliferació i la mort cel·lular²⁴³ i s'encarrega de solucionar qualsevol disrupció del citoesquelet. Donat que bona part de les proteïnes citoplasmàtiques precipitades tenien el seu origen en queratines, podria ser que aquestes precipitessin unides a la HSP70. Una altra possibilitat és que els pèptids DIF, i segurament també els pèptids 20-30, podrien unir-se als FI i desestabilitzar-los. És aleshores quan la HSP70 s'uniria als pèptids per tal d'intentar estabilitzar els FI.

Les seqüències proteiques dels FI, per tant, són molt similars entre elles i DIF-P es troba, almenys en forma parcial, en altres filaments diferents a la periferina. De fet, estudis previs del nostre laboratori van permetre determinar una seqüència consens present en gairebé tots els filaments intermedis, la qual presentava molts pocs canvis d'aminoàcids (figura 15, *Introducció*). A més a més, aquests canvis mantenien sempre un patró similar d'aminoàcids. Tenint en compte que aquesta seqüència consens es troba en altres FI, es va voler analitzar si aquests mantenien l'efecte apoptòtic de DIF-P. Per fer-ho, es va analitzar l'efecte dels fragments equivalents a DIF-P de diverses queratines (KRT9, KRT13, KRT32 i KRT84), així com de la lamin A (LMNA). Gairebé totes aquestes seqüències van presentar cert efecte apoptòtic, similar al del pèptid DIF-P. Tot i així, en cap cas aquest superava el nivell dels pèptids DIF-P3K i DIF-P8R. L'únic pèptid que no va mostrar un efecte apoptòtic en cap dels dos temps analitzats va ser KRT9 (amb i sense cua d'arginines) que, curiosament, és l'únic pèptid que només conté els 9 aminoàcids de la seqüència consens. La resta de pèptids, en canvi, presenten una llargada lleugerament major, la qual cosa suggereix la necessitat dels 3 aminoàcids previs a la seqüència consens per a que aquesta pugui exercir la seva funció citotòxica, al menys, en la concentració i temps analitzats. És possible que allargant el temps d'exposició a KRT9 (i KRT9-8R) o bé augmentant la concentració d'aquest, poguéssim observar cert efecte citotòxic. De fet, estudis realitzats per l'equip del Dr. Barquineró han confirmat la capacitat hemolítica i proinflamatòria d'aquest pèptid amb temps més perllongat d'exposició cel·lular. En conjunt, els resultats suggereixen que la seqüència consens que es troba en tots els FI és

capaç d'induir, en major o menor mesura, la mort cel·lular. A més a més, els resultats obtinguts amb els pèptids DIF-P3K, DIF-P8R i KRT18-8R suggereixen que aquest efecte apoptòtic es veu augmentat quan a la seqüència *core* se li afegeix una cua de lisines o arginines. Aquest augment de l'activitat citotòxica probablement és degut a que aquestes cues actuen com a CPPs, permetent una millor internalització de la seqüència *core* dins les cèl·lules i, per tant, millorant la seva eficàcia. Un CPP es defineix com un pèptid de menys de 30 aminoàcids que es caracteritza per un gran contingut d'aminoàcids bàsics, com són la lisina i l'arginina²⁴⁴. És per això que es va voler determinar si l'augment de l'efecte citotòxic de DIF-P3K i DIF-P8R respecte DIF-P era degut a la naturalesa de la cua, o bé pel simple fet de tenir un pèptid més llarg, independentment de la naturalesa dels aminoàcids que se li afegissin. Per fer-ho, es va utilitzar un pèptid en que es va modificar la cua de lisines per una cua d'Alanina-Tirosina-Treonina (DIFc-AYT), eliminant així la càrrega positiva de les cues de DIF-P3K i DIF-P8R. DIFc-AYT tampoc induïa de manera clara l'apoptosi de les cèl·lules. També es va realitzar un estudi amb els pèptids DIFc-AK i DIFc-CK, els quals contenien una sola lisina en el extrem A-terminal o C-terminal de la seqüència consens. En conjunt, els resultats confirmen la hipòtesi que la cua de lisines, i segurament també la d'arginines, actua com a CPP millorant la internalització de DIF-P a la cèl·lula i, per tant, augmentant la seva activitat.

El següent pas va ser intentar determinar quins dels aminoàcids de la seqüència consens eren essencials per a la seva activitat citotòxica. Per fer-ho, vam realitzar un escaneig d'alanines (de l'anglès, *alanine scanning*) del pèptid DIF-P3K. El sol canvi d'un aminoàcid en la seva seqüència anul·lava l'activitat citotòxica del pèptid, indicant que tots els aminoàcids analitzats són essencials per a l'activitat d'aquesta seqüència consens. Això es veia recolzat per els resultats obtinguts amb el pèptid *scrambled*, el qual tampoc va ser capaç d'induir la mort de les cèl·lules. En conjunt, aquests resultats suggereixen que és la seqüència en si mateixa, i no un conjunt aleatori d'aminoàcids, amb unes característiques de pes molecular, pH i punt isoelectric concrets, la que té aquest efecte apoptòtic.

Un cop demostrats els efectes *in vitro* dels diversos pèptids derivats de la periferina, el següent pas va ser intentar determinar a través de quina via actuen. Estudis previs del nostre laboratori realitzats en PBMCs humans, suggereixen que la via de mort cel·lular programada que activen les diverses variants de DIF-P canvia en funció del pèptid, activant-se la caspasa-1 i la caspasa-3 quan la internalització del pèptid és menor (com en el cas de DIF-P), però només la caspasa-3 quan les concentracions citoplasmàtiques són

més elevades²¹⁶. En el present estudi, es va voler analitzar si aquesta activació de caspasa-1 i caspasa-3 es donava també en monòcits d'origen murí i, a més a més, si aquesta activació era mantinguda al llarg del temps. A diferència dels resultats obtinguts amb els PBMCs humans, els monòcits de medul·la òssia de ratolí sembla que activen ambdues vies. A més a més, el percentatge de cèl·lules amb caspasa-1 i caspasa-3 actives augmenta amb el temps. Aquests resultats suggereixen que els pèptids poden estar activant simultàniament diverses vies de mort cel·lular. L'activació de la caspasa-1 suggereix que DIF-P3K i, en menor mesura, DIF-P i DIF-P8R són capaços d'induir la mort per piroptosi dels monòcits de medul·la òssia de ratolí i, per tant, serien capaços d'induir la producció de citocines proinflamàtores, malgrat caldria realitzar estudis per confirmar aquest efecte proinflamatori dels pèptids. La piroptosi és un tipus de mort cel·lular no silenciosa per al sistema immunitari, la qual cosa posa de manifest l'interès en l'ús d'aquests pèptids *in vivo* per tal de potenciar respostes immunitàries enfront a patògens o cèl·lules tumorals. D'altra banda, l'activació de la caspasa-3 suggereix que, simultàniament a la mort per piroptosi, s'activa l'apoptosi, la qual és silenciosa per al sistema immunitari. Donat que en monòcits de medul·la òssia hi ha una clara activació de la caspasa-3 quan es cultiven amb els diferents pèptids, es va voler estudiar si aquesta s'activava a través de la via intrínseca o extrínseca de l'apoptosi. L'apoptosi intrínseca és una forma de mort cel·lular regulada que pot iniciar-se per una gran varietat d'estímuls, com per exemple dany a l'ADN, estrès de reticle endoplasmàtic o sobrecàrrega de ROS, entre d'altres⁶⁵⁻⁷⁰. En resposta a un d'aquests estímuls, les proteïnes pro-apoptòtiques (com BAX, BAK o BOB) generen porus a la membrana externa del mitocondri⁵⁸, la qual cosa dona lloc a l'alliberament de citocrom C, entre d'altres components, al citosol^{71,72}. Això activa una via de senyalització que acaba amb l'activació de la caspasa-9⁷³, la qual, al seu torn, activa a les caspases executores caspasa-3 i caspasa-7, induint així la destrucció cel·lular^{59,61}. L'apoptosi extrínseca, en canvi, és un tipus de mort cel·lular programada que es genera en resposta a pertorbacions en el microentorn extracel·lular⁷⁷⁻⁸⁰. És induïda a través de receptors de membrana (com FAS i TNFR1), que activen una via de senyalització que acaba amb l'activació de la caspasa-8, que alhora activa a les caspases efectores caspasa-3 i caspasa-7, desencadenant així la mort de la cèl·lula^{59,61}. Per analitzar quin tipus d'apoptosi desencadena l'activació de la caspasa-3 en cèl·lules tractades amb els pèptids DIF, es va realitzar un estudi de citotoxicitat en MEFs doble *knock out* per als gens BAX i BAFF. Els diversos pèptids, van ser capaços d'induir la mort en aquest tipus cel·lular, la qual cosa suggereix que l'activació de la caspasa-3 és independent de la via intrínseca de l'apoptosi.

El següent pas per determinar el mecanisme a través del qual els diferents pèptids manifesten les seves activitats citotòxiques i immunoestimuladores, va ser realitzar diversos estudis histològics que permetessin determinar on es localitzaven els pèptids quan realitzaven la seva acció. D'una banda, en ambdós estudis es va poder veure que DIF-P8R es localitzava tant al citoplasma com en el nucli cel·lular, tot i que ho feia de manera més important en aquest últim. És en aquesta última localització on creiem que realitzaria la seva acció induïnt la mort per apoptosi de les cèl·lules. D'altra banda, malgrat no es va observar un patró clar de tinció de les cèl·lules HEP-2 incubades amb DIF-P, semblava que aquest pèptid es podria trobar majoritàriament en el citoplasma envoltant el nucli de les cèl·lules. Paral·lelament, els resultats dels estudis de criomicroscòpia electrònica, també localitzaven DIF-P en el citoplasma i, en menor mesura, en el nucli cel·lular. Aquesta diferència entre els dos estudis podria explicar-se per la baixa capacitat de DIF-P de penetrar la membrana nuclear, de manera que a l'interior del nucli es podria trobar en molt baixes quantitats, indetectables mitjançant els estudis de fluorescència. Això explicaria també la seva baixa capacitat citotòxica en comparació amb el pèptid DIF-P8R, que sí que penetra al nucli de manera evident. D'altra banda, la localització nuclear del pèptid 72-8R però no del pèptid 72, fa pensar que és la cua de 8 arginines la que permet l'entrada tant del 72-8R com del DIF-P8R a l'interior del nucli cel·lular. Tot i així, malgrat els pèptids 72-8R i DIF-P8R presentaven un patró nuclear, aquest era clarament diferent, la qual cosa suggereix que la mort de les cèl·lules no és causada per les 8 arginines, sinó que és la diana de DIF-P la causant de l'apoptosi. En resum, els resultats dels diversos estudis histològics realitzats semblen indicar que els pèptids DIF-P i DIF-P8R tenen la seva diana tant en el citoplasma com en el nucli cel·lular, la qual provoca els efectes citotòxics d'aquestes molècules. A més a més, els resultats suggereixen que la cua de 8 arginines de DIF-P8R facilita l'entrada d'aquest al nucli de la cèl·lula, facilitant així el contacte d'aquest amb la diana nuclear i, per tant, mostrant un major efecte apoptòtic.

Per intentar determinar quina era aquesta diana nuclear causant de les propietats dels pèptids es va realitzar una precipitació de les proteïnes nuclears que s'unien als pèptids DIF-P i DIF-P8R, així com als controls sense pèptid, 72 i 72-8R. Estudis previs del nostre laboratori van mostrar que, al menys en la fracció citoplasmàtica, DIF-P i DIF-P8R interaccionen amb queratines (i altres FI) així com amb diverses xaperones, entre les quals destaca la HSP70²¹⁶. Les bandes obtingudes en la precipitació de les proteïnes nuclears, però, tenen un pes molecular molt menor, la qual cosa suggereix que la diana nuclear de

DIF-P és diferent a la diana citoplasmàtica d'aquest. De fet, els resultats de l'espectrometria de masses semblen indicar que aquesta diana podria ser la hnRNPA2B1. Malgrat la funció principal d'aquesta ribonucleoproteïna és la d'unir-se a pre-ARNm per tal d'estabilitzar-lo, jugant un paper en processos com la transcripció, el processament de l'ARNm, l'exportació nuclear d'ARN i l'estabilitat dels ARNm madur, s'ha vist que aquesta proteïna també podria tenir un paper en la iniciació de la resposta immunitària innata en resposta a ADN víric²⁴⁵. hnRNPA2B1 actua com a sensor nuclear d'ADN en la immunitat i la inflamació innates. S'ha descrit que, després de la infecció per HSV-1, degut a la presència d'ADN genòmic viral al nucli de les cèl·lules, s'activa l'arginina demetilasa JMJD6 mitjançant homo-oligomerització. El dímer de JMJD6 indueix la desmetilació del dímer hnRNPA2B1 i promou la translocació al citoplasma d'aquest que, en última instància, indueix l'expressió d'IFNs de tipus I mitjançant la senyalització TBK1-IRF3. En condicions fisiològiques, quan hnRNPA2B1 es troba metilat, s'uneix a diversos ARNm provocant que aquests estiguin restringits al nucli. Entre ells es troba el ARNm de IFI16. Durant una infecció, l'IFI16 nuclear desencadena una resposta immune innata contra la invasió patògena a través de dos mecanismes principals. D'una banda, el IFI16 (unit a ADN de doble cadena) es trasllada al citoplasma on indueix la producció d'IFNs de tipus I a través de les vies de senyalització TBK1-IRF3 i NF-Kb. A més a més, l'IFI16 nuclear activat recluta a ASC i a la procaspasa-1 per formar un inflammasoma activat que es trasllada al citoplasma. Aquest inflammasoma indueix la maduració de les proformes de la IL-1 β i la IL-18²⁴⁶. Malgrat no es tracta d'una infecció vírica, els resultats de la precipitació suggereixen que les propietats proinflamatòries de DIF-P podrien ser degudes, al menys en part, a la unió del pèptid amb hnRNPA2B1, la qual cosa explicaria l'activació de la caspasa-1 així com la producció de citocines proinflamatòries.

D'altra banda, DIF-P i DIF-P8R van precipitar dues bandes de 14-19 kDa en les fraccions nuclears concentrades. A l'analitzar-les per espectrometria de masses, es va veure que aquestes podrien ésser diferents histones. En les tincions de fluorescència de *C. luciliae* es va poder observar la tinció del quinetoplast, la qual cosa sembla indicar que la diana de DIF-P8R podria ser ADN de doble cadena, el qual està molt unit a les histones. En conjunt, els resultats dels estudis de proteòmica fan dubtar si realment els pèptids DIF tenen capacitat d'unir-se a les histones, o bé si aquestes precipiten perquè estan unides a l'ADN, de manera que a l'unir-se aquest als pèptids acaben precipitant les histones. Tot i així, el pèptid DIF-P sense la cadena de 8 arginines, el qual no mostra un patró de fluorescència

d'ANA positiu, també precipita les mateixes dues bandes corresponents a les histones. Això fa pensar que aquesta especificitat podria ser real. És necessari realitzar més estudis per acabar de determinar amb certesa la diana nuclear dels pèptids DIF. D'altra banda, cal recalcar que aquests resultats també suggereixen que el reconeixement de les dianes podria estar relacionat amb el tampó utilitzat en la precipitació, ja que l'extracte nuclear concentrat es troba en un buffer diferent al no concentrat.

Una pregunta que ens intriga és fins a quin punt la presència de la cua de 8 arginines és responsable del patró de fluorescència d'ANA positiu que observem en el DIF-P8R. Els resultats observats amb el pèptid 72-8R semblen indicar que podria ser així, ja que aquest pèptid també acaba tenint un patró nuclear que el pèptid 72 sense les 8 arginines no posseeix. Tot i així, encara és una incògnita si aquesta “nova” especificitat del pèptid DIF-P8R és la causant de la mort cel·lular tan ràpida que s'observa quan aquest s'afegeix en els cultius cel·lulars així com del la inflamació que desencadena. De tota manera, és temptador relacionar-ho amb el procés inflamatori que es dona en el lupus, malaltia en el que els anticossos contra ADN són una causa remarcable de tot el procés inflamatori que es desencadena.

Per últim, i malgrat el pèptid 72-8R no és el nostre objecte d'estudi, només afegir que la diana nuclear d'aquest pèptid sembla ser una deacetilasa d'histones (SIRT7). SIRT7 és membre de la família de les sirtuïnes, una família de proteïnes deacetilases dependents de NAD⁺. SIRT7 és un mediador clau de moltes activitats cel·lulars, que influeix en múltiples processos biològics, com la transcripció, la biogènesi del ribosoma, l'estructura de la cromatina i la proliferació cel·lular. SIRT7 regula l'expressió gènica afectant directament la transcripció i/o processament de gens específics, o desacetilant H3K18, que reprimeix la transcripció i estabilitza el fenotip cancerós mitjançant una reprogramació epigenètica. Tot i que es necessiten més estudis per desxifrar els mecanismes subjacents a les funcions fisiològiques i relacionades amb les malalties de SIRT7, la implicació de SIRT7 en diverses patologies humanes el converteixen en un objectiu prometedor per a nous enfocaments terapèutics per a diverses malalties.

Donades les propietats citotòxiques així com els efectes immunoestimuladors dels pèptids DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R observats en els estudis *in vitro*, es va decidir fer un salt als estudis *in vivo* per tal d'estudiar el seu potencial com a agents immunoteràpics contra el càncer. Per fer-ho, es van realitzar diversos estudis de mort cel·lular immunogènica (ICD).

La ICD és reconeguda i acceptada pel seu valor predictiu a l'hora de traduir els resultats preclínic en investigació clínica, tant d'efectes preventius com terapèutics en el tractament del càncer. En el present estudi, es van utilitzar dos models tumorals murins diferents: el mastocitoma P815, derivat de ratolins DBA/2N, i el melanoma B16-F10, derivat de ratolins C57BL/6. Malgrat el primer no té un gran interès a nivell clínic, es va escollir donada la seva importància en l'expressió d'antígens específics de tumor com el P1A, els quals podrien ser diana del suposat atac immunitari generat pels pèptids derivats de la periferina. El segon model, en canvi, sí que té una gran repercussió clínica. Es tracta d'un tumor molt immunogènic amb elevada taxa de mortalitat en els estadis més avançats de desenvolupament. Durant el transcurs del present treball, es van realitzar diverses pautes d'immunitzacions (administració de les vacunes) per l'estudi de la ICD. En els primers assaigs, tot i que es va aconseguir una protecció (total i parcial) envers al desenvolupament de tumors, alguns dels ratolins van presentar tumors en el lloc de l'administració de la vacuna. Malgrat les vacunes presentaven menys d'un 20% de cèl·lules viables, aquestes eren capaces d'implantar-se i formar un tumor. És per això que en estudis posteriors es va decidir congelar les vacunes abans de la seva administració. Aquest pas en la producció de les vacunes va permetre obtenir un percentatge de mortalitat de gairebé el 100%, la qual cosa va eliminar la problemàtica de la formació de tumors en el lloc d'administració de les vacunes mantenint, però, els efectes beneficiosos d'aquestes. En general, els resultats obtinguts semblen suggerir que l'efectivitat de les vacunes d'ICD varia en funció del temps d'incubació de les cèl·lules tumorals amb els pèptids. Així doncs, DIF-P sembla ser més eficaç quan la incubació amb les cèl·lules tumorals és de 24 hores; DIF-P3K, quan s'incuba durant 1 hora; i DIF-P8R, durant 16 hores. Malgrat cal seguir realitzant estudis per determinar la pauta d'administració més efectiva dels pèptids DIF, sembla que aquests podrien convertir-se en una vacuna contra el càncer. A més a més, gràcies al valor predictiu dels experiments d'ICD a l'hora de traduir els resultats preclínic en investigació clínica, no només d'efectes preventius sinó també d'efectes terapèutics en el tractament del càncer, es podria considerar al conjunt de pèptids DIF un nou tipus de immunoteràpia contra el càncer, capaç d'actuar sobre les pròpies cèl·lules tumorals, induint-ne la seva mort, però també sobre les cèl·lules del sistema immunitari, activant-lo i donant lloc a una resposta antitumoral. De fet, diversos estudis han demostrat que els agents quimioterapèutics, a banda de tenir efectes antitumorals a través de l'efecte citotòxic directe, poden desencadenar una resposta immunitària antitumoral^{247,248}, la qual es desencadena per la mort de cèl·lules tumorals^{249,250}. Aleshores, les cèl·lules dendrítiques capturen antígens de cèl·lules

canceroses apoptòtiques, els processen, i els presenten a limfòcits T específics, activant-los i induint la seva proliferació. En aquest mateix sentit, s'ha determinat que l'augment de la infiltració de limfòcits induït per quimioteràpics en el microentorn tumoral pot prevenir el creixement de cèl·lules tumorals residuals i perllongar la supervivència global dels pacients^{251,252}. En el present treball, l'administració intratumoral de DIF-P, DIF-P3K i DIF-P8R ha demostrat ser eficaç ja que frena i, fins i tot redueix, la mida de tumors preformats. Primerament, es va administrar el pèptid DIF-P3K a ratolins DBA/2N amb tumors preestablerts per tal de determinar si els pèptids DIF es poden utilitzar com a agents immunoteràpics per ells mateixos, sense la necessitat d'actuar com a adjuvants en vacunes amb cèl·lules tumorals. Per a fer aquesta primera aproximació es va escollir DIF-P3K degut a que s'havia observat *in vitro* que era capaç d'induir una elevada mortalitat de les cèl·lules i que alhora, segons els estudis previs del nostre laboratori, era capaç d'induir una resposta immunitària en monòcits murins²¹⁶. La injecció intratumoral d'una sola dosi del pèptid va induir una clara necrosi del tumor en els dos ratolins, la qual cosa fa pensar que aquest es podria utilitzar com a agent quimioteràpic. Això es veu reforçat pels resultats obtinguts en el model de melanoma, en que l'administració intratumoral dels pèptids derivats de la periferina sembla frenar la velocitat de creixement del tumor. En aquest model, caldria fer més experiments per tal de determinar la dosi necessària no només per frenar el creixement del tumor sinó per induir una remissió d'aquest. Una possible manera de millorar l'eficàcia dels pèptids DIF com a tractament citotòxic podria ser l'alliberament lent d'aquests, potser mitjançant un sistema Depot. Això milloraria la captació i presentació d'antígens per part de les APCs, promovent una estimulació constant del sistema immunitari i una producció constant d'anticossos antitumorals. De totes maneres, tant la estabilització com la reducció de la mida dels tumors que es va observar podrien ser degudes a la capacitat citotòxica dels pèptids, que mata les cèl·lules tumorals. Al morir, aquestes podrien estar alliberant DAMPs, els quals actuen com a senyals d'alerta per al sistema immunitari i promouen un atac immunitari contra les cèl·lules tumorals. A més a més, la capacitat immunoestimuladora de DIF-P i, en menor mesura, de DIF-P3K i DIF-P8R podria estar potenciant aquesta resposta immunitària. En conjunt, l'efecte citotòxic i immunoestimulador d'aquests pèptids causaria l'aturada en el creixement dels tumors i, en alguns casos, induiria una regressió d'aquests.

La injecció intratumoral dels pèptids DIF podria ser un tractament fàcil i eficaç per a tumors accessibles, com els melanomes cutanis. Tot i així, quan els tumors no són accessibles, cal

trobar eines per a dirigir la teràpia al lloc del tumor. La injecció sistèmica de tractaments antitumorals, però, pot causar una citotoxicitat no selectiva i la seva biodistribució no específica pot causar efectes secundaris no desitjats al sistema immunitari, afectant la melsa i la medul·la òssia²⁵³. Per tal d'evitar aquest i d'altres efectes secundaris deguts a la no especificitat dels pèptids DIF per a un tipus cel·lular concret, es van generar dos constructes amb el pèptid DIF-P3K units al pèptid iRGD, en forma cíclica i lineal. El pèptid iRGD és capaç d'unir-se a la integrina α_v , molt expressada en els vasos de nova formació característics del creixement tumoral, de manera que resulta molt eficaç per a alliberar fàrmacs en els tumors^{180,254}. Quan s'administren per via sistèmica, els pèptids solen patir una escissió proteolítica extensa, la qual cosa provoca que la seva vida mitjana en sang sigui curta²⁵⁵. Per aquest motiu, es va decidir realitzar el tractament amb DIF-P3K cada 24 hores al llarg d'una setmana. Malgrat la forma lineal de iRGD unida a DIF-P3K sembla ser més eficaç, els resultats obtinguts suggereixen que tant la forma cíclica com lineal de iRGD eren capaces de dirigir al pèptid DIF-P3K al lloc del tumor, on va reduir la velocitat de creixement del melanoma o, fins i tot en un dels ratolins, va induir una remissió d'aquest. Un cop aturat el tractament, els tumors reprenien el seu creixement normal. Això fa pensar que la injecció sistèmica del pèptid té un clar efecte citostàtic en el tumor, però no sembla capaç de promoure una resposta immunitària suficient per aturar el creixement d'aquest un cop es deixa d'administrar el tractament, posant de manifest la necessitat de DAMPs per activar *in vivo* aquesta característica dels pèptids derivats de la periferina. De nou, un sistema d'alliberament lent dels pèptids DIF podria ajudar no només a millorar la capacitat citotòxica dels pèptids sinó també a augmentar-ne la seva capacitat estimuladora del sistema immunitari.

En conclusió, els resultats del present estudi demostren que els diferents pèptids DIF tenen capacitats tant citotòxiques com immunoestimuladores, la qual cosa els converteix en bons candidats en el àmbit de la immunoteràpia del càncer. Els diversos estudis *in vivo* realitzats fins al moment demostren la seva eficàcia en els models de melanoma i mastocitoma, malgrat caldria seguir fent estudis per tal de determinar millor la pauta d'administració tant de les vacunes immunoterapèutiques com dels pèptids com a agents citostàtics i immunomoduladors. A més a més, durant el transcurs dels estudis *in vivo* no s'han observat efectes secundaris derivats de l'administració de les vacunes d'ICD així com dels pèptids DIF per si sols, la qual cosa suggereix que es podrien administrar en combinació amb altres

tractaments antitumorals existents. Aquesta administració combinada podria millorar no només la supervivència dels pacients oncològics sinó també la seva qualitat de vida.

CONCLUSIONS

PRIMERA. La T1D es considera una malaltia òrgan específica. Els nostres resultats indicarien que la malaltia podria ser sistèmica. A més de l'atac autoimmunitari a les cèl·lules β pancreàtiques, aquest també es produiria contra les cèl·lules dels DRG.

SEGONA. Les cèl·lules dels DRG dels ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-} presenten alteracions en la transcripció d'una gran varietat de gens. Això confirma que existeix una disrupció funcional en aquestes cèl·lules, la qual podria estar relacionada amb l'aparició i el desenvolupament de la T1D.

TERCERA. Molts d'aquests gens amb una expressió alterada estan, directa o indirectament, relacionats amb estrès de reticle. Les cèl·lules dels DRG, per tant, es troben sotmeses a elevats nivells d'estrès de reticle, evidenciant que aquest no és només un problema existent a les cèl·lules β , sinó que també es troba en les cèl·lules del SNP, l'altre objectiu conegut de la T1D.

QUARTA. L'origen d'aquest estrès és desconegut, però podria estar relacionat amb una alteració de l'homeòstasi del calci, la qual causaria una disfunció de les xaperones del RE i, en conseqüència, l'acumulació de proteïnes mal plegades en aquest compartiment. A més a més, alteracions en les vies de degradació d'aquestes proteïnes mal plegades farien que aquestes es segueixin acumulant.

CINQUENA. L'acumulació de proteïnes mal plegades fa que s'activin vies per a la degradació, com la via UBL. La Vcp és una ATPasa implicada en la degradació de molècules conjugades a Ub i es troba expressada a la baixa en els DRG de ratolins NOD i NOD.Rag2^{-/-}. Això suggereix que aquests ratolins podrien tenir una degradació deficient de les proteïnes ubiquitinligades.

SISENA. El conjunt d'aquest procés podria facilitar la presentació d'autoantígens en un context d'estrès i inflamació. Aquests autoantígens podrien ser la diana de la resposta contra el SNP, però també contra les cèl·lules β pancreàtiques, donant lloc a l'aparició de la T1D.

SETENA. La Scg5 podria tenir un paper en la resposta autoimmunitària característica de la T1D, la qual cosa recolza la hipòtesi que existeix una relació entre la degeneració neuronal i l'aparició de T1D.

VUITENA. Algunes de les alteracions observades en els DRG de ratolins NOD també es poden observar en leucòcits de sang perifèrica, tant de ratolins susceptibles a autoimmunitat com de pacients diabètics.

NOVENA. La detecció d'alteracions en aquests gens en cèl·lules de sang perifèrica es podria utilitzar com a un marcador per a detectar pacients susceptibles a desenvolupar T1D.

DESENA. El fragment DIF-P de la periferina pot actuar com un DAMP i induir inflamació gràcies a la seva capacitat d'activar la producció de citocines proinflamatòries. A més a més, DIF-P és capaç d'induir la mort en diferents tipus cel·lulars, tant murins com humans.

ONZENA. Quan s'afegeix una cua de lisines (DIF-P3K) o arginines (DIF-P8R) a aquest fragment de la periferina, la seva capacitat citotòxica augmenta, probablement degut a que aquestes cues d'aminoàcids actuen com a CPP i milloren la internalització del pèptid.

DOTZENA. L'efecte citotòxic dels pèptids és dependent de dosi. Això fa pensar que l'activitat proinflamatòria també podria ser-ho, essent major a concentracions més baixes dels pèptids.

TRETZENA. La seqüència *core* present en gairebé tots els FI presenta molts pocs canvis d'aminoàcids, sempre mantenint un patró del tipus d'aminoàcid substituït. Aquests fragments peptídics d'altres FI mantenen, en major o menor mesura, l'efecte apoptòtic i, probablement, també l'efecte immunoestimulador de la seqüència *core*.

CATORZENA. El canvi d'un sol aminoàcid per un altre que no es contempli en la seqüència consens de DIF-P, anul·la l'activitat citotòxica d'aquest fragment peptídic i, probablement, també es veuria suprimida la seva capacitat immunoestimuladora.

QUINZENA. Els pèptids DIF són capaços d'activar simultàniament dues vies independents de mort cel·lular: la piroptosi (caspasa-1) i l'apoptosi (caspasa-3). L'activació de l'apoptosi és independent de BAX i BAFF.

SETZENA. La cua d'arginines de DIF-P8R permet una millor internalització del pèptid a l'interior del nucli en comparació amb el pèptid DIF-P i, consegüentment, podria unir-se millor a la diana nuclear dels pèptids.

DISSETENA. Els nostres estudis indiquen que els pèptids DIF-P i DIF-P8R podrien tenir afinitat per a més d'una molècula del nucli cel·lular.

DIVUITENA. Els estudis de proteòmica indiquen que DIF-P pot interaccionar amb la proteïna hnRNPA2B1 en el compartiment nuclear. Les propietats proinflamatòries de DIF-P podrien ser degudes, al menys en part, a aquesta unió, que activaria la caspasa-1 i promouria la producció de citocines proinflamatòries. Els mateixos estudis també indiquen que DIF-P i DIF-P8R podrien interaccionar amb diferents histones.

DINOVENA. En les tincions de fluorescència de *C. luciliae* es va poder observar la tinció del quinetoplast, la qual cosa sembla indicar que DIF-P8R podria també tenir com a diana l'ADN de doble cadena.

VINTENA. Els pèptids derivats de la periferina són capaços de frenar o, fins i tot, inhibir el creixement tumoral en estudis de mort cel·lular immunogènica així com mitjançant la seva injecció intratumoral i/o sistèmica en els models murins de melanoma i mastocitoma. Això els converteix en noves immunoteràpies a considerar en el tractament del càncer.

ANNEX

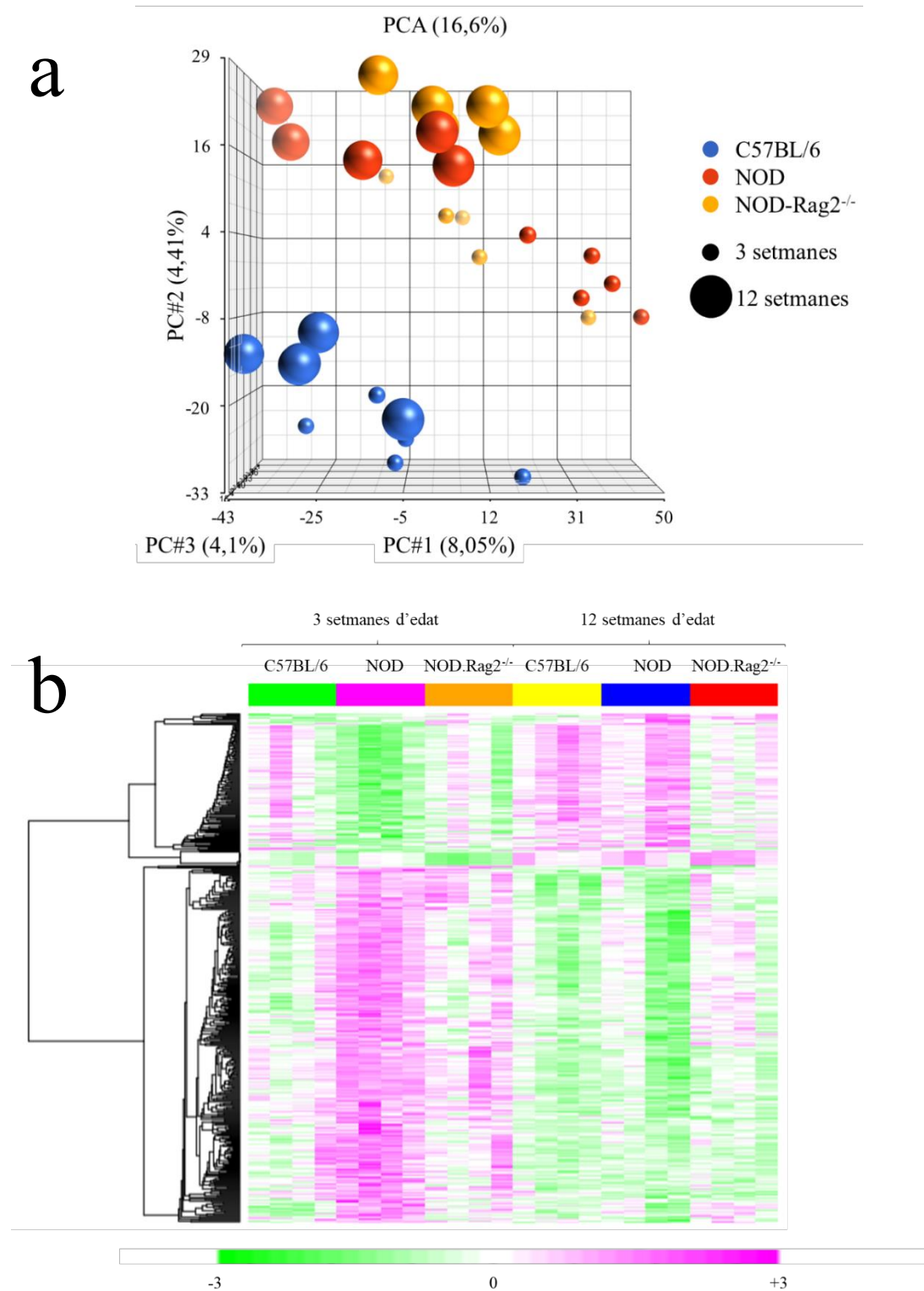


Figura 1, Annex. Comparació dels perfils d'expressió dels ratolins NOD, NOD-Rag2^{-/-} i C57BL/6 a les 3 i 12 setmanes d'edat. (a) Representació PCA (*Principal Component Analysis*) dels perfils d'expressió de les diferents soques. (b) *Heatmap* que representen una agrupació jeràrquica de gens. Els clústers amb valors d'expressió baixos es representen en verd, mentre que els que tenen valors d'expressió elevats es representen en vermell.

Taula 1, Annex. Gens diferencialment expressats entre soques, a les 3 setmanes, a les 12 setmanes o a ambdós temps. Les diferències es consideraven negatives quan el p-value ajustat era menor a 0,01 i el |LogFC| era superior a 1. Els valors no significatius estan en color vermell.

Gens	C570vsNOD0		C570vsRAG0		C5712vsNOD12		C5712vsRAG12	
	p-value	logFC	p-value	logFC	p-value	logFC	p-value	logFC
<i>Abhd1</i>	4,93E-08	-2,08	8,27E-07	-1,75	1,28E-05	-1,48	6,35E-06	-1,55
<i>S-adenosyl-homocysteine hydrolase</i>	6,31E-04	-2,03	0,01	-1,55	6,20E-03	-1,67	5,71E-03	-1,68
<i>Alad</i>	7,73E-04	-1,31	2,08E-03	-1,23	0,38	-0,52	7,30E-03	-1,07
<i>Alad</i>	7,73E-04	-1,31	2,08E-03	-1,23	0,38	-0,52	7,30E-03	-1,07
<i>Ar18a</i>	1,16E-04	1,49	3,87E-04	1,38	2,66E-04	1,4	1,96E-05	1,7
<i>Arnt2</i>	0,036	0,6	0,24	0,47	9,53E-03	0,84	1,34E-03	1,02
<i>Cc119</i>	2,94E-09	-2,6	6,59E-11	-3,09	1,80E-10	-2,96	1,12E-09	-2,7
<i>Cldn9</i>	0,31	0,29	0,11	0,6	7,74E-03	0,89	8,83E-03	0,87
<i>Crym</i>	0,02	0,71	0,08	0,67	5,37E-03	0,97	4,03E-03	0,99
<i>Cst12</i>	7,85E-04	-1,26	2,88E-03	-1,15	1,15E-04	-1,48	3,15E-04	-1,38
<i>Exosc9</i>	0,78	0,08	0,35	0,39	8,89E-03	0,82	1,58E-03	0,97
<i>Fau</i>	1,77E-04	-1,22	1,53E-03	-1,05	1,24E-05	-1,49	2,83E-05	-1,4
<i>Fbp2</i>	0,043	-0,76	0,01	-1,11	2,04E-04	-1,57	5,29E-04	-1,47
<i>Gabra2</i>	4,98E-03	-1,19	4,90E-04	-1,54	1,52E-03	-1,4	0,08	-0,822
<i>Gnpdal</i>	9,59E-06	-2,24	6,37E-05	-1,97	2,94E-06	-2,39	6,41E-07	-2,61
<i>Gst1</i>	8,86E-05	-1,32	5,49E-04	-1,16	6,80E-04	-1,14	8,93E-04	-1,11
<i>H2afz</i>	0,02	1,05	0,04	1,11	1,42E-03	1,61	5,71E-03	1,41
<i>H2-T22</i>	1,52E-06	2,87	3,99E-07	3,09	4,45E-07	3,08	6,35E-06	2,63
<i>Hddc3</i>	6,35E-04	-1,48	1,55E-03	-1,41	0,02	-1,06	0,02	-1,05
<i>Hjwp</i>	3,58E-03	1,06	2,46E-03	1,14	2,25E-04	1,37	1,71E-03	1,17
<i>Hspe1</i>	0,011	1,03	1,73E-03	1,34	1,61E-04	1,6	9,85E-04	1,4
<i>Ifln4</i>	5,64E-05	1,83	1,40E-04	1,73	1,58E-03	1,42	4,06E-05	1,88
<i>Itgb3bp</i>	2,42E-03	-1,09	8,28E-03	-1,00	0,21	-0,59	0,11	-0,63
<i>Lect1</i>	0,02	0,98	0,01	1,18	7,12E-04	1,51	9,16E-04	1,48
<i>Ly86</i>	6,89E-03	1,00	2,02E-03	1,19	4,92E-03	1,09	0,02	0,89
<i>Mamdc2</i>	3,50E-05	-1,79	1,93E-03	-1,33	2,64E-03	-1,28	0,02	-1,05
<i>Mett17a3</i>	3,63E-12	4,6	2,90E-12	4,59	3,41E-12	4,61	4,47E-12	4,5
<i>Metilació</i>								
<i>Mitf1</i>	4,20E-03	1,07	0,32	0,5	8,53E-04	1,27	1,61E-03	1,21

Continuació Taula 1, Annex. Gens diferencialment expressats entre soques, a les 3 setmanes, a les 12 setmanes o a ambdós temps.

Gens	Nom	C570vsNOD0		C570vsRAG0		C5712vsNOD12		C5712vsRAG12	
		p-value	logFC	p-value	logFC	p-value	logFC	p-value	logFC
<i>Mmp25</i>	Matrix metalloproteinase 25	2,12E-04	1,36	6,76E-03	1,02	1,92E-04	1,37	2,04E-04	1,37
<i>Mrgpra2b</i>	MAS-related GPR, member A2B	9,87E-07	1,64	4,01E-11	3,93	1,56E-11	4,13	4,47E-12	4,4
<i>Mrgpra3-4</i>	MAS-related GPR, member A3/A4	0,2	-0,4	0,06	-0,74	5,71E-05	-1,47	1,36E-03	-1,16
<i>Mrgprb4</i>	MAS-related GPR, member B4	2,13E-05	2,03	5,49E-05	1,91	0,16	0,78	0,15	0,69
<i>Mrgprx1</i>	MAS-related GPR, member X1	3,25E-06	1,79	4,64E-04	1,28	0,29	0,53	0,06	0,72
<i>Myo7a</i>	Myosin VIIA	0,06	0,58	0,35	0,44	7,47E-04	1,18	7,40E-04	1,19
<i>Nts</i>	Neurotensin	0,33	0,43	0,1	0,98	1,39E-03	1,67	6,32E-03	1,43
<i>Olfrl269</i>	Olfactory receptor 1269	1,91E-06	1,85	1,88E-07	2,11	2,04E-04	1,35	1,79E-03	1,14
<i>Osr2</i>	Odd-skipped related 2	3,52E-04	-1,66	1,01E-03	-1,57	0,99	-0,002	0,69	-0,31
<i>P4ha3</i>	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide III	0,052	0,65	0,26	0,54	6,62E-03	1,05	7,18E-03	1,03
<i>Pisd-ps3</i>	phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 3	3,85E-05	2,92	3,83E-03	2,05	8,93E-05	2,75	2,21E-05	3,04
<i>Pla2g4e</i>	phospholipase A2, group IVE	0,013	-0,73	1,57E-03	-1,00	7,75E-05	-1,25	2,86E-04	-1,14
<i>Ppp1r3e</i>	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3E	2,26E-04	1,31	2,34E-04	1,33	1,06E-05	1,65	3,34E-06	1,77
<i>Psmc3ip</i>	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3, interacting protein	1,50E-03	-1,29	4,75E-03	-1,19	8,35E-03	-1,12	1,48E-03	-1,32
<i>Pttg1</i>	Pituitary tumor-transforming gene 1	6,90E-07	2,11	2,48E-06	1,96	4,02E-09	2,74	4,35E-09	2,74
<i>Rian</i>	RNA imprinted and accumulated in nucleus	6,49E-05	2,43	1,06E-04	2,38	3,26E-04	2,16	1,47E-05	2,71
<i>Rpl29</i>	Ribosomal Protein L29	2,02E-09	3,35	2,58E-10	3,65	2,57E-10	3,65	2,72E-10	3,64
<i>Rpl3</i>	Ribosomal protein L3	1,72E-03	-1,38	4,95E-05	-1,88	2,90E-05	-1,92	1,14E-03	-1,46
<i>Rpl32</i>	Ribosomal protein L32	0,033	-0,81	0,01	-1,06	4,83E-06	-2,85	1,43E-04	-2,26
<i>Rpl34</i>	Ribosomal protein L34	1,80E-04	2,15	1,86E-05	2,57	4,33E-05	2,4	3,98E-03	1,67
<i>Rps12</i>	Ribosomal protein S12	7,31E-08	2,75	1,11E-08	2,98	1,72E-09	3,26	1,60E-09	3,29
<i>Rps19-ps4</i>	Ribosomal protein S19, pseudogene 4	6,77E-04	-1,15	0,02	-0,83	2,65E-03	-1,04	8,33E-05	-1,37
<i>Samd11</i>	Sterile alpha motif domain containing 11	1,93E-04	-1,44	3,91E-05	-1,65	7,43E-07	-2,08	6,35E-06	-1,84
<i>Scg5</i>	Secretogranin V	1,16E-04	-1,20	7,70E-06	-1,46	1,70E-05	-1,38	2,38E-05	-1,35
<i>Slc35a5</i>	Solute carrier family 35, member A5	1,95E-03	1,08	1,20E-03	1,17	1,07E-03	1,17	5,55E-03	1,00
<i>Slc39a8</i>	Solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 8	2,93E-04	-1,26	3,87E-04	-1,25	4,75E-05	-1,45	7,51E-06	-1,64
<i>Slc1c1</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 1c1	1,95E-03	-1,53	5,20E-04	-1,77	0,01	-1,32	0,03	-1,12
<i>Tagln2</i>	Transgelin 2	0,011	-0,78	0,02	-0,81	3,56E-03	-0,94	3,80E-03	-0,93
<i>Tdgl</i>	Thymine DNA	1,41E-05	-2,28	2,13E-03	-1,56	1,08E-03	-1,64	3,12E-03	-1,49

Continuació Taula 1, Annex. Gens diferencialment expressats entre soques, a les 3 setmanes, a les 12 setmanes o a ambdós temps.

Gens	Símbol	Nom	C570vsNOD0		C570vsRAG0		C5712vsNOD12		C5712vsRAG12	
			p-value	logFC	p-value	logFC	p-value	logFC	p-value	logFC
	<i>Tgm5</i>	<i>Transglutaminase 5</i>	0,07	-0,64	0,02	-1,02	8,01E-05	-1,61	1,48E-03	-1,28
	<i>Tgoln1-2</i>	<i>Trans-golgi network protein</i>	2,12E-04	1,07	1,62E-03	0,93	0,02	0,7	3,98E-03	0,84
	<i>Tmem132c</i>	<i>Transmembrane protein 132C</i>	8,72E-04	1,16	0,01	0,88	4,61E-03	1,02	1,49E-03	1,13
	<i>Tmem203</i>	<i>Transmembrane protein 203</i>	1,72E-03	-0,85	6,56E-03	-0,77	0,0005	-0,96	0,001	-0,86
	<i>Trpc3</i>	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 3</i>	7,27E-04	1,11	3,27E-03	1	0,1874	0,55	0,03	0,76
	<i>Vcp</i>	<i>Valosin containing protein</i>	2,77E-11	2,99	2,90E-12	3,34	1,92E-11	3,04	8,00E-12	3,15

Taula 2, Annex. Funcions associades als diversos gens diferencialment expressats. Breu descripció de la funció biològica dels gens amb una expressió diferencial en els assaigs de microarrays. Les diferències es consideraven negatives quan el p-value ajustat era menor a 0,01 i el |LogFC| era superior a 1.

Gen		Funció coneguda	Ref.
Símbol	Nom		
<i>Ahcy</i>	<i>S-adenosyl homocysteine hydrolase</i>	Biosíntesi d'homocisteïna. Enzim que catalitza la hidròlisi reversible de la S-adenosil-L-homocisteïna (SAH) a l'adenosina i la L-homocisteïna. Les metiltransferases dependents de SAM (S-Adenosil L-Metionina) transfereixen el grup metil de la SAH a una gran varietat de substrats (AND, ARNm, histones H3 i H4, etc.). La inhibició d' <i>Ahcy</i> dona lloc a l'acumulació cel·lular de SAH, inhibint així la metilació d'aquestes molècules.	256
<i>Alad</i>	<i>Aminolevulinate delta-dehydratase</i>	Implicat en la via de biosíntesi de l'hemoglobina: catalitza la condensació de dues molècules d'àcid aminolevulinic per formar porfobilinogen, que és el precursor de l'hemoglobina, dels citocroms i de les cobalamines. Podria interactuar amb el proteasoma i modular la seva activitat de manera dependent de dosi.	257-259
<i>Arl8a</i>	<i>ADP-ribosylation factor-like 8A</i>	<i>Small</i> GTPasa implicada en la segregació igual dels cromosomes. La reducció de la seva activitat induïx una morfologia anormal en la segregació dels cromosomes. Es localitza als lisosomes i afecta la seva mobilitat.	235,260
<i>Arntl2</i>	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2</i>	Regula la proliferació de les cèl·lules T CD4 ⁺ CD25 ⁺ , creant un desequilibri en la proporció entre les cèl·lules T-efectores i les cel·lules T-reguladores (CD4 ⁺ CD25 ⁺). S'uneix al promotor del gen de la IL-21 i inhibeix la seva expressió en ratolins NOD. <i>Arntl2</i> s'ha associat al locus <i>Idd6</i> , essent un gen de susceptibilitat a desenvolupar T1D. Factor de transcripció que regula els ritmes circadians.	261-263
<i>Ccl19</i>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 19</i>	Regula les respostes immunitàries no només atraient leucòcits, sinó també proporcionant senyals per modificar el destí de les cèl·lules T, que semblen afavorir la diferenciació de les cèl·lules T CD4 ⁺ naïf en cèl·lules efectores després de l'estimulació per part de l'antigen.	264,265
<i>Ccl2</i>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	Quimiocina que regula la migració i la infiltració de monòcits/macròfags, limfòcits T de memòria i cèl·lules NK.	266-268
<i>Cldn9</i>	<i>Claudin 9</i>	Component de fibres <i>tight-junction</i> . Paper en el manteniment de la polaritat cel·lular i com a transductor de senyal.	269

Continuació Taula 2, Annex. Funcions associades als diversos gens diferencialment expressats.

Gen		Funció coneguda	Ref.
Símbol	Nom		
<i>Crym</i>	<i>Crystllin mu</i>	Regulador clau del transport TH-T3. Redueix les amines cíclics, derivades d'aminoàcids de sofre. Pot tenir un paper com a neurotransmissor.	270,271
<i>Cst12</i>	<i>Cystatin 12</i>	Inhibidor competitiu de les cisteïn-proteases. Paper en la regulació de la proteòlisi.	272
<i>Exosc9</i>	<i>Exosome component 9</i>	Activitat d'exoribonucleasa de 3' a 5'. Té un paper en el processament i degradació de l'ARN.	273
<i>Fau</i>	<i>Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived)</i>	Factor immunosupressor present en macròfags i cèl·lules T. Citocina que pot inhibir una resposta immunitària de manera inespecífica d'antígen. Regula l'apoptosi. Inhibeix la secreció d'IL-4 per part de les cèl·lules Th2, així com la producció de TNF α per part de macròfags i limfòcits estimulats per LPS.	274
<i>Fbp2</i>	<i>Fructose biphosphatase 2</i>	Paper en la síntesi de glicogen a partir de precursors carbohidrats com el lactat. És inhibid per Ca ²⁺ .	275
<i>Gabra2</i>	<i>GABA-A receptor, subunit alpha 2</i>	Subunitat del receptor GABA-A. Funció en la percepció del dolor. Media la inhibició neuronal mitjançant la unió al receptor GABA/benzodiazepina i l'obertura d'un canal integral de clorur.	276-278
<i>Gnpda1</i>	<i>Glucosamine-6-phosphate isomerase 1</i>	Gen <i>housekeeping</i> implicat en el metabolisme de les hexoses fosfat.	279
<i>Gstol</i>	<i>Glutathione S-transferase omega 1</i>	Paper en la protecció contra l'estrès oxidatiu. Implicat en l'activació d'IL-1 β , modulant la resposta inflamatòria. Pot inhibir els canals de Ca ²⁺ del receptor de la ryanodina. Paper en el cicle de glutationilació que sorgeix com a mecanisme regulador de la funció de les proteïnes.	280-282
<i>H2-T22</i>	<i>Histocompatibility 2, T region locus 22</i>	Implicat en el processament i presentació d'antígens a través de MHC-I.	283
<i>H2afz</i>	<i>H2A histone family, member Z</i>	Variant molt conservada de l'histona H2A, coneguda per estar associada a nucleosomes adjacents al lloc d'inici de la transcripció. La seva presència s'ha relacionat amb canvis dinàmics en l'expressió gènica.	284,285
<i>Hddc3</i>	<i>HD domain containing 3</i>	Paper en el metabolisme de les purines. Activitat fosfatasa NADPH amb paper en la eliminació de cèl·lules danyades per trastorns metabòlics i redox mitjançant ferroptosi.	286
<i>Hist1h2b</i>	<i>H2B histone pseudogene 6</i>	Relacionat amb la reparació de dany al ADN de doble cadena (<i>Double-Strand Break</i> o DSB).	287

Continuació Taula 2, Annex. Funcions associades als diversos gens diferencialment expressats.

Gen		Funció coneguda	Ref.
Símbol	Nom		
<i>Hjrp</i>	<i>Holliday junction recognition protein</i>	Proteïna centromèrica amb un paper crucial en el reclutament de CENP-A i el seu muntatge en nucleosomes.	288
<i>Hspe1</i>	<i>Heat shock protein 1 (Chaperonin 10)</i>	Paper important en el plegament, muntatge i translocació de proteïnes. Inhibeix l'activitat ATPasa de CPN60. La seva sobreexpressió inhibeix la mort per apoptosi o necrosis de les cèl·lules.	289-291
<i>Ifna4</i>	<i>Interferon α-4</i>	Produït per macròfags. Té activitats antivirals i estimula la producció de dos enzims: una proteïna quinasa i una oligoadenilat sintetasa.	292
<i>Itgb3bp</i>	<i>Integrin β3 binding protein (β3-endonexin)</i>	<i>Itgb3bp</i> s'uneix a la ciclina-A i inhibeix la seva activitat pRB quinasa. L'activitat de la quinasa H1 de la ciclina-A no es veu afectada. Paper en la divisió cel·lular.	293-295
<i>Lect1</i>	<i>Leukocyte cell derived chemotaxin 1</i>	Factor anti-angiogènec al cartílag	296
<i>Ly86</i>	<i>Lymphocyte antigen 86</i>	En associació amb RP105, promou l'activació dels limfòcits B i regula la resposta immunitària contra els lipopolisacàrids (LPS).	297
<i>Mamdc2</i>	<i>MAM domain containing 2</i>	S'uneix als glicosaminoglicans i fa <i>cross-linking</i> de pèptids.	
<i>Mettl7a3</i>	<i>Methyltransferase like 7A3</i>	Activitat metiltransferasa.	
<i>Mid1</i>	<i>Midline 1</i>	Activitat de la ubiquitina ligasa E3. Afavoreix la monoubiquitinació de IGBP1, resultant en la desprotecció de la subunitat catalítica PP2A.	233,234
<i>Mmp25</i>	<i>Matrix metalloproteinase 25</i>	Mediador de la resposta immunitària innata. Processament extracel·lular de la vimentina, que és un quimiotàctic de monòcits.	298,299
<i>Mrgpra2alb</i>	<i>MAS-related GPR, member A2A/A2B</i>	Activitat de receptor acoblat a la proteïna G. Associat a la propiocepció.	300,301
<i>Mrgpra3/4</i>	<i>MAS-related GPR, member A3/A4</i>	Activitat de receptor acoblat a la proteïna G. Associat a la propiocepció.	300,301
<i>Mrgprb4</i>	<i>MAS-related GPR, member B4</i>	Activitat de receptor acoblat a la proteïna G. Associat a la propiocepció.	300,301
<i>Mrgprx1</i>	<i>MAS-related GPR, member X1</i>	Activitat de receptor acoblat a la proteïna G. Associat a la propiocepció.	300,301
<i>Myo7a</i>	<i>Myosin VIIA</i>	Transport intracel·lular.	
<i>Nts</i>	<i>Neurotensin</i>	Pot tenir un paper endocrí o paracrí en la regulació del metabolisme dels greixos. Neurotransmissor i neuromodulador al sistema nerviós. Hormona local als teixits perifèrics. Factor de creixement de diferents tipus de cèl·lules i cèl·lules tumorals.	302

Continuació Taula 2, Annex. Funcions associades als diversos gens diferencialment expressats.

Gen		Funció coneguda	Ref.
Símbol	Nom		
<i>Olfr1269</i>	<i>Olfactory receptor 1269</i>	Receptor olfatiu.	303
<i>Osr2</i>	<i>Odd-skipped related 2</i>	Factor de transcripció que pot estar implicat en la síntesi i la funció hormonal.	304,305
<i>P4ha3</i>	<i>Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide III</i>	Metabolisme proteic.	306
<i>Pisd-ps3</i>	<i>Phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 3</i>	Catalitza la formació de fosfatidiletanolamina a partir de fosfatidilserina. Metabolisme dels fosfolípids.	307
<i>Pla2g4e</i>	<i>Phospholipase A2, group IVE</i>	Fosfolipasa dependent del calci que hidrolitza l'enllaç sn-2 dels glicerofosfolípids que produeixen àcids grassos lliures i lisofosfolípids.	308
<i>Ppp1r3e</i>	<i>Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3E</i>	Metabolisme del glicogen.	
<i>Psmc3ip</i>	<i>Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase3, interacting protein</i>	Reparació eficient dels DSB. Funcions crítiques en la recombinació homòloga. Juntament amb MND1, interactua amb les recombinases DMC1 i RAD51 i estimula la seva activitat. Aquesta interacció és essencial en la meiosi.	309
<i>Pttg1</i>	<i>Pituitary tumor-transforming gene 1</i>	Proteïna reguladora important en l'estabilitat dels cromosomes. Inhibidor de la separasa, una proteasa necessària per a la separació de les cromàtides germanes. Pttg1 inhibeix la segregació dels cromosomes i, per tant, atura el cicle cel·lular. Paper important en la reparació de l'ADN.	310-312
<i>Rian</i>	<i>RNA imprinted and accumulated in nucleus</i>	Regulació negativa de la proliferació cel·lular.	313
<i>Rpl29</i>	<i>Ribosomal protein L29</i>	Té funcions reguladores importants en el ribosoma i ajuda a mantenir una taxa sintètica de proteïnes normal.	313
<i>Rpl3</i>	<i>Ribosomal protein L3</i>	Ajuda a mantenir una taxa sintètica de proteïnes normal.	313
<i>Rpl32</i>	<i>Ribosomal protein L32</i>	Ajuda a mantenir una taxa sintètica de proteïnes normal.	313
<i>Rpl34</i>	<i>Ribosomal protein L34</i>	Ajuda a mantenir una taxa sintètica de proteïnes normal.	313
<i>Rps12</i>	<i>Ribosomal protein S12</i>	Ajuda a mantenir una taxa sintètica de proteïnes normal.	313
<i>Rps19-ps4</i>	<i>Ribosomal protein S19, pseudogene 4</i>	Ajuda a mantenir una taxa sintètica de proteïnes normal.	313
<i>Samd11</i>	<i>Sterile alpha motif domain containing 11</i>	Pot tenir un paper en la transcripció d'àcids nucleics.	314

Continuació Taula 2, Annex. Funcions associades als diversos gens diferencialment expressats.

Gen		Funció coneguda	Ref.
Símbol	Nom		
<i>Scg5</i>	<i>Secretogranin V</i>	Xaperona de la pro-proteïna convertasa 2 (PC2). PC2, juntament amb PC1/3, s'encarrega del processament de prohormones i proneuropèptids. <i>Scg5</i> també facilita el transport de PC2 des del RE fins a compartiments més tardans de la via secretora.	237-240
<i>Slc35a5</i>	<i>Solute carrier family 35, member A5</i>	Transport de carbohidrats.	
<i>Slc1c1</i>	<i>Solute carrier organic anion transporter</i>	Intervé en el transport d'alta afinitat independent de Na ⁺ d'anions orgànics, com ara les hormones tiroïdals tiroxina (T4) i rT3. Pot tenir un paper important en la regulació del flux de T4 dins i fora del cervell.	
<i>Tagln2</i>	<i>Transgelin 2</i>	Diferenciació de cèl·lules epitelials. Promou la resposta de limfòcits T en la sinapsi immunitària.	315
<i>Tdg</i>	<i>Thymine DNA glycosylase</i>	Desmetilació de l'ADN. Reparació de l'ADN.	316
<i>Tgm5</i>	<i>Transglutaminase 5</i>	Catalitza el <i>cross-link</i> de proteïnes i la conjugació de proteïnes amb poliamines.	317
<i>Tgoln1-2</i>	<i>Trans-golgi network protein</i>		
<i>Tmem132c</i>	<i>Transmembrane protein 132C</i>	Regulació negativa de l'activitat fosfatasa.	
<i>Tmem203</i>	<i>Transmembrane protein 203</i>	Regulació de l'homeostasi cel·lular de calci.	227
<i>Trpc3</i>	<i>Transient receptor potential cation channel, subfamily C, membre 3</i>	Canal de calci.	
<i>Vcp</i>	<i>Valosin containing protein</i>	Implicada en la formació del reticle endoplasmàtic de transició (tER). En associació amb NPLOC4 i UFD1L regula el desmuntatge del fus al final de la mitosi i és necessària per a la formació d'un embolcall nuclear tancat. Implicada en la resposta al dany a l'ADN: es recluta als llocs de DSB de manera dependent de RNF8 i RNF168 i promou el reclutament de TP53BP1 als llocs de dany a l'ADN. Implicat en la degradació de proteïnes ubiquitinades. Interacciona de forma selectiva i no covalent amb molècules MHC-I, responsables del reconeixement de limfòcits i de la presentació de l'antigen.	232

Taula 3, Annex. Proteïnes identificades per espectrometria de masses de la banda 1. Extracte proteic nuclear de cèl·lules NALM-6 amb el pèptid 72-8R-Biotina. MW = *Molecular Weight*, pI = punt isoelectric, SC = *Spectral Counts*, RMS90 = *Root Mean Square*. En negreta es marquen totes les proteïnes que, per pes molecular, podrien correspondre a la banda 1. En verd es resalta la que creiem que realment s'està detectant.

Proteïna	MW [kDa]	pI	Score	# SC	SC [%]	RMS90 [ppm]
Keratin, type II cytoskeletal 1	66	8,8	1858,6	51	33,5	0,6
Keratin, type I cytoskeletal 10	58,8	5	1578	52	27,2	0,31
Keratin, type II cytoskeletal 2	65,4	8,9	1329,9	44	23,2	0,42
Keratin, type I cytoskeletal 9	62	5	495	16	21,3	0,58
Keratin, type I cytoskeletal 14	51,5	4,9	434,6	4	7,6	0,53
Keratin, type II cytoskeletal 6B	60	8,9	397,5	1	1,8	0,37
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	33,6	4,8	347,5	19	21,6	0,38
Alpha-galactosidase	53,2	5,5	337,8	11	31,9	0,5
Keratin, type II cytoskeletal 6A	60	8,9	335,9	2	4,6	0,14
Myosin-7	223	5,5	332,6	12	7,5	0,59
Keratin, type II cytoskeletal 5	62,3	8,6	283,3	5	7,5	0,56
NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-7	44,9	10,8	236,1	6	18,8	0,92
Albumin	69,2	6	211,6	10	6,8	0,55
Transthyretin	12,6	5,3	129,3	7	50,4	0,66
Actin, cytoplasmic 1	37,3	5,4	102,5	5	11,1	0,58
Actin, aortic smooth muscle	42	5,1	99,1	1	7,7	0,92
T cell receptor alpha joining 56 (Fragment)	2,2	10,3	68,3	14	38,1	0,9
Histone H4	11,4	11,8	60,9	2	17,5	0,7
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, isoform CRA_d	31,1	9,1	46,5	1	3,3	0,39
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	21,1	4,8	39,9	1	5,7	0,58
Collagen alpha-3(VI) chain	343,5	6,3	33,9	1	0,5	1,62
Desmoglein-1	113,7	4,8	31,2	1	1,5	0,02
Cartilage matrix protein	53,7	9	29,5	1	1,8	0,07
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59,7	9,6	25,8	1	2,7	0,31
Vimentin (Fragment)	16,4	10,3	25,7	1	12,8	0,01
Protein piccolo	560,4	6	24,9	1	0,2	0,13
Myosin light chain 3	21,9	4,9	24,6	1	6,7	0,85
Desmin	53,5	5,1	24,3	1	3,2	0,02
Transcription factor AP-2-delta	49,5	9,3	24,1	1	1,5	0,13
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	30,3	8,7	22,5	1	5	0,26
F-box only protein 50	30,8	6,2	22,5	1	4,4	0,99
THO complex subunit 4	26,9	11,6	21,8	1	4,3	0,62
Histone H2A	18,5	11,5	21,3	1	4,1	0,94
Vitronectin	54,3	5,5	20,7	1	3,1	0,51

Taula 4, Annex. Proteïnes identificades per espectrometria de masses de la banda 2. Extracte proteic nuclear de cèl·lules NALM-6 amb el pèptid 72-8R-Biotina. MW = *Molecular Weight*, pI = punt isoelectric, SC = *Spectral Counts*, RMS90 = *Root Mean Square*. En negreta es marquen totes les proteïnes que, per pes molecular, podrien correspondre a la banda 1. En verd es resalta la que creiem que realment s'està detectant.

Proteïna	MW [kDa]	pI	Score	# SC	SC [%]	RMS90 [ppm]
Keratin, type II cytoskeletal 1	66	8,8	2059,8	70	35,6	0,42
Keratin, type I cytoskeletal 9	62	5	952,4	32	21	0,31
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65,4	8,9	720,3	20	11	0,36
Keratin, type II cytoskeletal 5	62,3	8,6	310,8	2	4,2	0,2
NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-7	44,9	10,8	218	4	10,5	0,42
Keratin, type I cytoskeletal 10	58,8	5	216	7	8,2	0,33
Albumin	69,2	6	192,5	7	3,6	0,27
Alpha-galactosidase	53,2	5,5	191,3	7	18,1	0,53
Nucleophosmin	22,2	4,5	120,2	7	25,4	1,65
T cell receptor alpha joining 56 (Fragment)	2,2	10,3	108,6	24	38,1	0,05
Histone H4	11,4	11,8	91,8	4	29,1	0,21
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	33,6	4,8	65,4	4	2,9	0,09
Histone H2A	18,5	11,5	60,8	3	9,5	0,52
Myosin-7	223	5,5	45,8	1	1	0,09
Actin, cytoplasmic 1 (Fragment)	8,8	9,3	40,5	2	13,9	0,08
Keratin, type I cytoskeletal 13	49,6	4,8	39,7	1	2,6	0,07
Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	13,9	10,8	36,4	2	14,3	0,26
Transthyretin	12,6	5,3	34,8	1	19,1	1,39
Cartilage matrix protein	53,7	9	31,2	1	1,8	0,37
THO complex subunit 4	26,9	11,6	30,7	1	4,3	0,53
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	21,1	4,8	29,8	1	5,7	0,38
Protein piccolo	560,4	6	25	2	0,2	0,19
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	61	9,3	25	1	2,7	0,74
Arginase-1	25,6	8,4	23	1	4,6	0,02
DNA-binding protein inhibitor ID-3	13	5,5	21	2	5,9	0,05
Heat shock 70 kDa protein 1B	70,1	5,5	20	1	1,9	0,41

Taula 5, Annex. Proteïnes identificades per espectrometria de masses de la banda 3. Extracte proteic nuclear de cèl·lules NALM-6 amb el pèptid DIF-P-Biotina. MW = *Molecular Weight*, pI = punt isoelèctric, SC = *Spectral Counts*, RMS90 = *Root Mean Square*. En negreta es marquen totes les proteïnes que, per pes molecular, podrien correspondre a la banda 1. En verd es resalta la que creiem que realment s'està detectant.

Proteïna	MW [kDa]	pI	Score	# SC	SC [%]	RMS90 [ppm]
Keratin, type II cytoskeletal 1	66	8,8	5177,8	135	44,9	0,39
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65,4	8,9	4599,9	132	37,4	0,39
Keratin, type I cytoskeletal 10	58,8	5	3540	129	35,6	0,31
Keratin, type I cytoskeletal 9	62	5	2063,4	73	29,5	0,3
Keratin, type II cytoskeletal 6B	60	8,9	1234,3	15	12,1	0,24
Keratin, type II cytoskeletal 6A	60	8,9	1156,9	12	8,2	0,26
Keratin, type I cytoskeletal 16	51,2	4,8	1114,4	16	17,5	0,27
Keratin, type I cytoskeletal 14	51,5	4,9	1100,2	6	7,2	0,76
Keratin, type II cytoskeletal 5	62,3	8,6	968,5	20	15,1	0,39
Histone H1.2	21,4	11,4	641,8	23	29,1	0,54
Keratin, type II cytoskeletal 1b	61,9	5,6	618	8	9,9	0,25
Histone H1.5	22,6	11,4	390,6	10	12,8	0,42
Albumin	69,2	6	241,1	9	5,3	0,35
NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-7	44,9	10,8	240,2	6	17,2	0,45
Desmoplakin	331,6	6,4	189,1	9	3	0,21
Keratin, type II cytoskeletal 71	57,3	6,3	97,8	3	2,3	1,52
Actin, cytoplasmic 1	37,3	5,4	92,3	4	11,1	0,18
T cell receptor alpha joining 56 (Fragment)	2,2	10,3	86	12	38,1	0,23
Histone H2A	18,5	11,5	79,7	4	9,5	0,77
Alpha-galactosidase	53,2	5,5	76,5	3	8,7	0,38
Junction plakoglobin	81,7	5,7	73,4	3	2,8	0,45
Histone H4	11,4	11,8	64,8	4	40,8	0,36
Arginase-1	25,6	8,4	60,9	3	4,6	0,52
Keratinocyte proline-rich protein	64,1	10,6	55,3	4	3,6	0,54
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	21,1	4,8	51	1	5,7	0,28
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, isoform CRA_d	31,1	9,1	47	1	3,3	0,18
Desmoglein-1	113,7	4,8	46,8	2	2,8	457,58
THO complex subunit 4	26,9	11,6	46,4	1	4,3	0,56
Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	13,9	10,8	45,7	2	14,3	0,16
Desmocollin-1	99,9	5,1	44,8	2	1,7	0,03
Caspase-14	27,7	5,3	42,3	1	4,5	0,41
Plakophilin-1	82,8	10,1	40	1	2	0,67
Peroxiredoxin-1	10,7	9,6	39,5	1	11,3	0,02
Histone H3	13,6	11,8	33,8	2	5,8	1,3

Continuació Taula 5, Annex. Proteïnes identificades per espectrometria de masses de la banda 3.

Protein	MW [kDa]	pI	Score	# SC	SC [%]	RMS90 [ppm]
Tubulin alpha-1C chain	36,6	8,5	31,8	1	2,8	0,06
1,4-beta-N-acetylmuramidase C	15,3	9	26,9	1	8,8	0,17
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36	9,3	26,8	1	4,5	0,11
Protein piccolo	560,4	6	25,6	2	0,2	0,07
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59,7	9,6	25,3	1	2,7	0,16
Clusterin	52,5	5,9	25,2	1	2,4	0,32
Tropomyosin 1 (Alpha), isoform CRA_o (Fragment)	32,7	4,7	24,8	1	4,6	0,42
Hornerin	282,2	10,4	24,6	1	0,7	0,22
60S ribosomal protein L27 (Fragment)	16,5	10,6	24,1	1	6,2	0,43
Catalase	59,7	7	23,9	1	2,5	1,32
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5 (Fragment)	17,1	5,9	23,9	1	6	0,13
Cartilage matrix protein	53,7	9	23,7	1	1,8	0,25
Hemoglobin subunit alpha (Fragment)	13,9	9,1	20,8	1	11,2	0,35
Protein S100-A8	10,8	6,6	20,2	1	11,8	1,25

Taula 6, Annex. Proteïnes identificades per espectrometria de masses de la banda 4. Extracte proteic nuclear de cèl·lules NALM-6 amb el pèptid DIF-P-Biotina. MW = *Molecular Weight*, pI = punt isoelèctric, SC = *Spectral Counts*, RMS90 = *Root Mean Square*. En negreta es marquen totes les proteïnes que, per pes molecular, podrien correspondre a la banda 1. En verd es resalta la que creiem que realment s'està detectant.

Protein	MW [kDa]	pI	Score	# SC	SC [%]	RMS90 [ppm]
NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-7	44,9	10,8	204,7	4	6,8	0,5
Albumin	69,2	6	183,8	9	3,6	0,56
Keratin, type II cytoskeletal 1	66	8,8	157,8	7	6,5	0,47
Keratin, type I cytoskeletal 10	58,8	5	97,2	3	1,4	0
Alpha-galactosidase	53,2	5,5	80,2	3	8,3	0,58
Histone H2A	18,5	11,5	59,1	3	9,5	0,67
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, isoform CRA_d	31,1	9,1	45,6	1	3,3	0,02
T cell receptor alpha joining 56 (Fragment)	2,2	10,3	45,4	11	38,1	0,27
Histone H4	11,4	11,8	38,6	3	17,5	0,18
Actin, cytoplasmic 1	37,3	5,4	34,5	2	6,3	0,17
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	61	9,3	32,8	1	2,7	1,1
Cartilage matrix protein	53,7	9	30,9	1	1,8	0,18
Histone H2B type 1-A	14,2	10,8	28,4	1	7,1	0,03
Tubulin alpha-1C chain	36,6	8,5	21,6	1	2,8	0,63
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59,7	9,6	21,4	1	2,2	0,27
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	30,3	8,7	21	1	5	1,07

Taula 7, Annex. Proteïnes identificades per espectrometria de masses de la banda 5. Extracte proteic nuclear de cèl·lules NALM-6 amb el pèptid DIF-P-Biotina. MW = *Molecular Weight*, pI = punt isoelectric, SC = *Spectral Counts*, RMS90 = *Root Mean Square*. En negreta es marquen totes les proteïnes que, per pes molecular, podrien correspondre a la banda 1. En verd es resalta la que creiem que realment s'està detectant.

Protein	MW [kDa]	pI	Score	# SC	SC [%]	RMS90 [ppm]
Keratin, type II cytoskeletal 1	66	8,8	4636,2	120	39,3	0,68
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65,4	8,9	3663,6	104	36,2	0,53
Keratin, type I cytoskeletal 10	58,8	5	3198,9	116	41,1	0,45
Keratin, type I cytoskeletal 14	51,5	4,9	1559,8	18	22,2	0,52
Keratin, type I cytoskeletal 9	62	5	1509,7	56	35	0,44
Keratin, type I cytoskeletal 16	51,2	4,8	1405,1	6	13,3	0,72
Keratin, type II cytoskeletal 6B	60	8,9	1153,3	14	14,9	0,5
Keratin, type II cytoskeletal 6A	60	8,9	1028,2	11	9,8	0,76
Keratin, type II cytoskeletal 5	62,3	8,6	944,5	21	18,1	0,42
Keratin, type II cytoskeletal 1b	61,9	5,6	500	2	3,1	0,28
Albumin	69,2	6	173,1	9	6,8	0,49
NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-7	44,9	10,8	143,7	4	10,5	0,53
T cell receptor alpha joining 56 (Fragment)	2,2	10,3	126,9	15	38,1	0,05
Keratin, type II cytoskeletal 71	57,3	6,3	87,7	1	2,3	1,35
Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	13,9	10,8	86,4	3	14,3	0,16
Keratinocyte proline-rich protein	64,1	10,6	81,8	5	5,4	0,22
Arginase-1	25,6	8,4	70,4	3	9,3	0,44
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, isoform CRA_d	31,1	9,1	63	1	3,3	0,49
Histone H2A	18,5	11,5	60,4	2	9,5	0,31
Histone H4	11,4	11,8	53,5	2	9,7	0,16
Desmoplakin	331,6	6,4	53,2	4	1,4	0,18
Cartilage matrix protein	53,7	9	51,9	2	1,8	0,06
Actin, cytoplasmic 1	37,3	5,4	43,9	2	5,7	0,41
Prohibitin	29,8	5,5	40,4	1	3,7	0,14
Alpha-galactosidase	53,2	5,5	39,4	2	5,7	0,54
Skin-specific protein 32	26,2	0	39	1	3,2	0,15
Histone H3	13,6	11,8	36,7	2	5,8	0,94
Peroxiredoxin-1	10,7	9,6	35,6	1	11,3	0,28
Junction plakoglobin	81,7	5,7	34,6	1	1,6	0,19
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene 48	29,2	9,5	32,1	1	3,6	0,44
Desmoglein-1	113,7	4,8	30,7	1	1,5	0,74

Continuació Taula 7, Annex. Proteïnes identificades per espectrometria de masses de la banda 5.

Protein	MW [kDa]	pI	Score	# SC	SC [%]	RMS90 [ppm]
Protein piccolo	560,4	6	29,1	2	0,2	0,19
Keratin, type II cytoskeletal 78	56,8	5,7	28,7	1	2,5	0,61
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	3,9	4,4	26,3	1	25,7	0,08
60S ribosomal protein L27 (Fragment)	16,5	10,6	23,8	1	6,2	0,09
Macrophage migration inhibitory factor	12,5	9,1	22,7	1	7,8	0,05
RNA-binding protein FUS	53,4	9,7	21	1	3	0,43

Taula 8, Annex. Proteïnes identificades per espectrometria de masses de la banda 6. Extracte proteic nuclear de cèl·lules NALM-6 amb el pèptid DIF-P8R-Biotina. MW = *Molecular Weight*, pI = punt isoelèctric, SC = *Spectral Counts*, RMS90 = *Root Mean Square*. En negreta es marquen totes les proteïnes que, per pes molecular, podrien correspondre a la banda 1. En verd es resalta la que creiem que realment s'està detectant.

Protein	MW [kDa]	pI	Score	# SC	SC [%]	RMS90 [ppm]
Keratin, type II cytoskeletal 1	66	8,8	1146,9	30	18,6	0,65
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65,4	8,9	822,3	25	13,1	0,26
Keratin, type I cytoskeletal 10	58,8	5	522,5	20	15,2	0,39
Keratin, type I cytoskeletal 9	62	5	464,7	21	9	0,28
Albumin	69,2	6	190,9	8	3,6	0,67
Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	13,9	10,8	181,4	10	25,4	0,82
Keratin, type I cytoskeletal 14	51,5	4,9	170,8	4	5,7	0,72
Keratin, type II cytoskeletal 6B	60	8,9	169,1	2	4,8	0,3
Keratin, type II cytoskeletal 5	62,3	8,6	112,6	6	8,3	0,38
NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-7	44,9	10,8	103,9	3	6,8	0,56
Histone H3 (Fragment)	14,9	11,3	86,4	9	18,9	0,4
Actin, cytoplasmic 1	37,3	5,4	68,2	5	8,7	0,18
Histone H2A	18,5	11,5	65,1	3	5,3	0,21
T cell receptor alpha joining 56 (Fragment)	2,2	10,3	38,1	12	38,1	0,16
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	21,1	4,8	32,8	1	5,7	0,13
Histone H4	11,4	11,8	31,9	1	9,7	0,16
Tubulin alpha-1C chain	36,6	8,5	24,3	1	2,8	0,39
Heat shock 70 kDa protein 1B	70,1	5,5	22,3	1	1,9	0,41
Cartilage matrix protein	53,7	9	21,5	1	1,8	0,19
Arginase-1	25,6	8,4	21,3	1	4,6	0,78

Taula 9, Annex. Proteïnes identificades per espectrometria de masses de la banda 7. Extracte proteic nuclear de cèl·lules NALM-6 amb el pèptid DIF-P8R-Biotina. MW = *Molecular Weight*, pI = punt isoelèctric, SC = *Spectral Counts*, RMS90 = *Root Mean Square*. En negreta es marquen totes les proteïnes que, per pes molecular, podrien correspondre a la banda 1. En verd es resalta la que creiem que realment s'està detectant.

Protein	MW [kDa]	pI	Score	# SC	SC [%]	RMS90 [ppm]
Keratin, type II cytoskeletal 1	66	8,8	341,1	14	7,9	0,37
Histone H2A	13,5	10,6	239,4	18	20,5	1,71
Albumin	69,2	6	220,4	9	3,6	0,71
Keratin, type I cytoskeletal 10	58,8	5	167,5	5	5,1	0,43
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65,4	8,9	158,4	5	7	0,46
NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-7	44,9	10,8	108,4	3	6,8	1,11
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	21,1	4,8	51,4	1	5,7	0,88
Keratin, type II cytoskeletal 5	62,3	8,6	46,8	2	1,9	0,15
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, isoform CRA_d	31,1	9,1	46,5	1	3,3	0,29
T cell receptor alpha joining 56 (Fragment)	2,2	10,3	41,3	12	38,1	0,05
Histone H2B type 1-B	13,9	10,8	39,1	2	14,3	0,34
Cartilage matrix protein	53,7	9	38,3	1	1,8	0,18
Alpha-galactosidase	53,2	5,5	34,9	2	6,2	0,2
Histone H4	11,4	11,8	28,3	2	17,5	0,19
Protein piccolo	560,4	6	27,1	2	0,2	0,01
Keratin, type I cytoskeletal 9	62	5	24,4	1	1,4	0,42
Tubulin alpha-1C chain	36,6	8,5	21,4	1	2,8	0,63
Heat shock 70 kDa protein 1B	70,1	5,5	20,2	1	1,9	0,51
Actin, cytoplasmic 1 (Fragment)	8,8	9,3	20,2	1	13,9	0,22

Augment de pes (%)

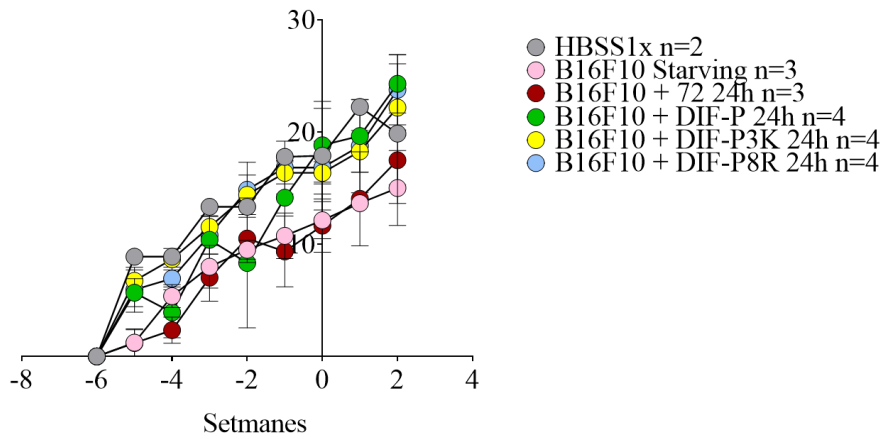


Figura 2, *Annex*. Seguiment del pes dels ratolins amb tres immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules B16-F10 incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids i posteriorment congelades.

Augment de pes (%)

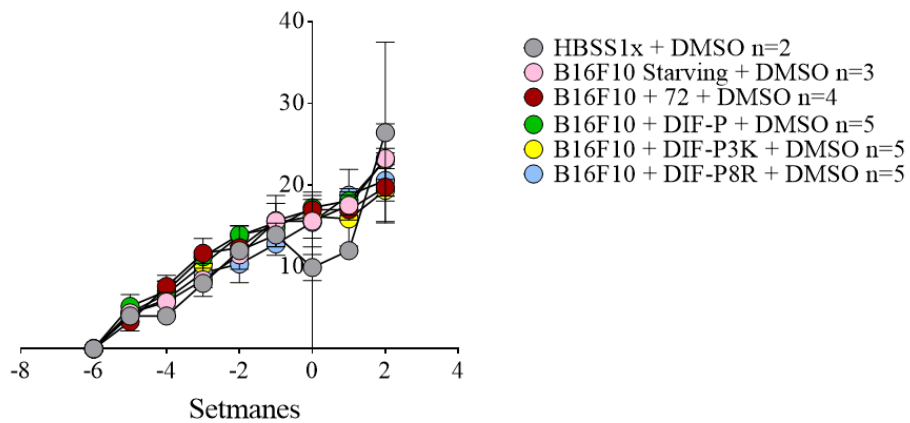


Figura 3, *Annex*. Seguiment del pes dels ratolins immunitzats 3 vegades amb tres immunitzacions, cada 15 dies, de cèl·lules B16-F10 incubades durant 24 hores amb els diferents pèptids i DMSO, i posteriorment congelades.

BIBLIOGRAFIA

1. Roszer, T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm.* **2015**, (2015).
2. Arnold, C. E. *et al.* A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology* **141**, 96–110 (2013).
3. Duluc, D. *et al.* Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* **110**, 4319–4330 (2007).
4. Davis, M. J. *et al.* Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio* **4**, e00264-13 (2013).
5. Griffith, J. W., Sokol, C. L. & Luster, A. D. Chemokines and chemokine receptors: Positioning cells for host defense and immunity. *Annual Review of Immunology.* **32**, 659–702 (2014).
6. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology.* **13**, 159–175 (2013).
7. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* **303**, 1532–1535 (2004).
8. Berek, C. Eosinophils: Important players in humoral immunity. *Clin. Exp. Immunol.* **183**, 57–64 (2016).
9. Uhm, T. G., Kim, B. S. & Chung, Y. Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Allergy, Asthma and Immunology Research.* **4**, 68–79 (2012).
10. Hogan, S. P. *et al.* Eosinophils: Biological properties and role in health and disease. *Clinical and Experimental Allergy.* **38**, 709–750 (2008).
11. Kato, Y. *et al.* Leukotriene D4 Induces Production of Transforming Growth Factor- β 1 by Eosinophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **137**, 17–20 (2005).
12. Bandeira-Melo, C., Bozza, P. T. & Weller, P. F. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, 393–400 (2002).
13. Holowka, D. & Baird, B. Nanodomains in early and later phases of FC ϵ RI signalling. *Essays Biochem.* **57**, 147–163 (2015).
14. Schraml, B. U. & Reis e Sousa, C. Defining dendritic cells. *Current Opinion in Immunology.* **32**, 13–20 (2015).
15. Chung, C. Y. J., Ysebaert, D., Berneman, Z. N. & Cools, N. Dendritic cells: Cellular mediators for immunological tolerance. *Clinical and Developmental Immunology.* **2013**, (2013).
16. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* **327**, 656–661 (2010).
17. Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H. S., Lewis, K. L. & Sisirak, V. Plasmacytoid dendritic cells: Recent progress and open questions. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 163–183 (2011).

18. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563–604 (2013).
19. Pahl, J. H. W., Cerwenka, A. & Ni, J. Memory-Like NK cells: Remembering a previous activation by cytokines and NK cell receptors. *Frontiers in Immunology.* **9**, 2796 (2018).
20. Lanier, L. L., Phillips, J. H., Hackett, J., Tutt, M. & Kumar, V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol.* **137**, 2735–2739 (1986).
21. Hayakawa, Y. & Smyth, M. J. CD27 Dissects Mature NK Cells into Two Subsets with Distinct Responsiveness and Migratory Capacity. *J. Immunol.* **176**, 1517–1524 (2006).
22. Zhou, L., Chong, M. M. W. & Littman, D. R. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* **30**, 646–655 (2009).
23. Murphy, K. M. & Reiner, S. L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 933–944 (2002).
24. Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N. & Forsthuber, T. G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* **74**, 5–17 (2015).
25. Dupage, M. & Bluestone, J. A. Harnessing the plasticity of CD4 + T cells to treat immune-mediated disease. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 149-163 (2016).
26. Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121–1133 (2006).
27. Kolls, J. K. & Lindén, A. Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity* **21**, 467–476 (2004).
28. Ye, P. *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* **194**, 519–527 (2001).
29. Huang, W., Na, L., Fidel, P. L. & Schwarzenberger, P. Requirement of Interleukin-17A for Systemic Anti-*Candida albicans* Host Defense in Mice. *J. Infect. Dis.* **190**, 624–631 (2004).
30. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGF β in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity* **24**, 179–189 (2006).
31. Wing, K. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* **11**, 7–13 (2010).
32. Ziegler, S. F. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur. J. Immunol.* **37**, 21–23 (2007).
33. Workman, C. J., Szymczak-Workman, A. L., Collison, L. W., Pillai, M. R. & Vignali, D. A. A. The development and function of regulatory T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2603–2622 (2009).

34. Miyara, M. & Sakaguchi, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol. Med.* **13**, 108–116 (2007).
35. Crotty, S. Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621–663 (2011).
36. Kitano, M. *et al.* Bcl6 Protein Expression Shapes Pre-Germinal Center B Cell Dynamics and Follicular Helper T Cell Heterogeneity. *Immunity* **34**, 961–972 (2011).
37. Reinhardt, R. L., Liang, H.-E. & Locksley, R. M. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat. Immunol.* **10**, 385–393 (2009).
38. Hirahara, K. *et al.* Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 1276–1287 (2013).
39. Geginat, J. *et al.* Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front. Immunol.* **5**, 630 (2014).
40. Dardalhon, V. *et al.* IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3(-) effector T cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1347–1355 (2008).
41. Tan, C. & Gery, I. The unique features of Th9 cells and their products. *Crit. Rev. Immunol.* **32**, 1–10 (2012).
42. Chang, H.-C. *et al.* The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat. Immunol.* **11**, 527–534 (2010).
43. Liu, J. *et al.* IL-9 regulates allergen-specific Th1 responses in allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1903–1911 (2014).
44. Lee, Y. K. *et al.* Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* **30**, 92–107 (2009).
45. Kaplan, M. H., Hufford, M. M. & Olson, M. R. The Development and in vivo function of Th9 cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 295 (2015).
46. Andersen, M. H., Schrama, D., Straten, P. T. & Becker, J. C. Cytotoxic T Cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 32–41 (2006).
47. Allman, D. & Pillai, S. Peripheral B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 149–157 (2008).
48. Alt, F. W., Honjō, T., Radbruch, A. & Reth, M. *Molecular biology of B cells: Second edition.* (Elsevier Inc., 2014).
49. Yam-Puc, J. C., Zhang, L., Zhang, Y. & Toellner, K.-M. Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation. *F1000Research* **7**, 1–9 (2018).
50. Cerutti, A., Cols, M. & Puga, I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 118–132 (2013).

51. Gaudin, E., Rosado, M., Agenes, F., McLean, A. & Freitas, A. A. B-cell homeostasis, competition, resources, and positive selection by self-antigens. *Immunol. Rev.* **197**, 102–115 (2004).
52. Attanavanich, K. & Kearney, J. F. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J. Immunol.* **172**, 803–811 (2004).
53. Bendelac, A., Bonneville, M. & Kearney, J. F. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 177–186 (2001).
54. Tsay, G. J. & Zouali, M. The Interplay Between Innate-Like B Cells and Other Cell Types in Autoimmunity. *Front. Immunol.* **9**, 1064 (2018).
55. Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 959–971 (2013).
56. Stebegg, M. *et al.* Regulation of the Germinal Center Response. *Front. Immunol.* **9**, 2469 (2018).
57. Batista, F. D. & Harwood, N. E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 15–27 (2009).
58. Gudipaty, S. A., Conner, C. M., Rosenblatt, J. & Montell, D. J. Unconventional Ways to Live and Die: Cell Death and Survival in Development, Homeostasis, and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **34**, 311–332 (2018).
59. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486 (2018).
60. Galluzzi, L. *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* **14**, 1237–1243 (2007).
61. Kim, E. H., Wong, S.-W. & Martinez, J. Programmed Necrosis and Disease: We interrupt your regular programming to bring you necroinflammation. *Cell Death Differ.* **26**, 25–40 (2019).
62. Silva, M. T. Secondary necrosis: The natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett.* **584**, 4491–4499 (2010).
63. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **140**, 883 (2010).
64. Messmer, M. N., Snyder, A. G. & Oberst, A. Comparing the effects of different cell death programs in tumor progression and immunotherapy. *Cell Death Differ.* **26**, 115–129 (2019).
65. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 49–63 (2014).
66. Pihán, P., Carreras-Sureda, A. & Hetz, C. BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death Differ.* **24**, 1478–1487 (2017).
67. Roos, W. P., Thomas, A. D. & Kaina, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 20–33 (2016).

68. Vitale, I., Manic, G., De Maria, R., Kroemer, G. & Galluzzi, L. DNA Damage in Stem Cells. *Mol. Cell* **66**, 306–319 (2017).
69. Nuñez, G. *et al.* Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J. Immunol.* **144**, 3602–3610 (1990).
70. Brumatti, G., Salmanidis, M. & Ekert, P. G. Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 1619–1630 (2010).
71. Fulda, S. & Debatin, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798–4811 (2006).
72. Kile, B. T. The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 214–217 (2009).
73. Cain, K. *et al.* Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J. Biol. Chem.* **275**, 6067–6070 (2000).
74. Segawa, K. *et al.* Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science* **344**, 1164–1168 (2014).
75. Sebbagh, M. *et al.* Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol.* **3**, 346–352 (2001).
76. Nagata, S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 853–875 (2005).
77. Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305–1308 (1998).
78. Flusberg, D. A. & Sorger, P. K. Surviving apoptosis: life–death signaling in single cells. *Trends Cell Biol.* **25**, 446–458 (2015).
79. Gibert, B. & Mehlen, P. Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. *Cancer Res.* **75**, 5171–5175 (2015).
80. Strasser, A., Jost, P. J. & Nagata, S. The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. *Immunity* **30**, 180–192 (2009).
81. Wajant, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **296**, 1635–1636 (2002).
82. Panzarini, E., Inguscio, V. & Dini, L. Immunogenic Cell Death: Can It Be Exploited in PhotoDynamic Therapy for Cancer? *Blood* **119**, 651–665 (2012).
83. Goldschneider, D. & Mehlen, P. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* **29**, 1865–1882 (2010).
84. Ichim, G. & Tait, S. W. G. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 539–548 (2016).
85. Jorgensen, I. & Miao, E. A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol. Rev.* **265**, 130–142 (2015).

86. Guo, H., Callaway, J. B. & Ting, J. P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* **21**, 677–687 (2015).
87. Sharma, D. & Kanneganti, T.-D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J. Cell Biol.* **213**, 617–629 (2016).
88. Zoete, M. R. de, Palm, N. W., Zhu, S. & Flavell, R. A. Inflammasomes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a016287 (2014).
89. Frank, D. & Vince, J. E. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death Differ.* **26**, 99–114 (2019).
90. Songane, M., Khair, M. & Saleh, M. An updated view on the functions of caspases in inflammation and immunity. *Semin. Cell Dev. Biol.* **82**, 137–149 (2018).
91. Taabazuing, C. Y., Okondo, M. C. & Bachovchin, D. A. Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages. *Cell Chem. Biol.* **24**, 507-514.e4 (2017).
92. Shi, J. *et al.* Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* **514**, 187–192 (2014).
93. Monie, T. P. & Bryant, C. E. Caspase-8 Functions as a Key Mediator of Inflammation and pro-IL-1 β Processing via Both Canonical and Non-Canonical Pathways. *Immunol. Rev.* **265**, 181–193 (2015).
94. Serrano-del Valle, A., Anel, A., Naval, J. & Marzo, I. Immunogenic Cell Death and Immunotherapy of Multiple Myeloma. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 50 (2019).
95. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 97–111 (2017).
96. Panzarini, E., Inguscio, V. & Dini, L. Immunogenic Cell Death: Can It Be Exploited in PhotoDynamic Therapy for Cancer? *Biomed Res. Int.* **2013**, 1–18 (2013).
97. Panaretakis, T. *et al.* Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* **28**, 578–590 (2009).
98. Trautmann, A. Extracellular ATP in the Immune System: More Than Just a ‘Danger Signal’. *Sci. Signal.* **3**, 56 (2009).
99. Apetoh, L. *et al.* Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* **13**, 1050–1059 (2007).
100. Dumitriu, I. E. *et al.* Release of High Mobility Group Box 1 by Dendritic Cells Controls T Cell Activation via the Receptor for Advanced Glycation End Products. *J. Immunol.* **174**, 7506–7515 (2005).
101. Vacchelli, E. *et al.* Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1. *Science*. **350**, 972–978 (2015).
102. Tsai, S., Shameli, A. & Santamaria, P. Chapter 4 CD8+ T Cells in Type 1 Diabetes. *Adv. Immunol.* **100**, 79–124 (2008).
103. Tisch, R. & McDevitt, H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* **85**, 291–297 (1996).

104. Bate, K. L. & Jerums, G. 3: Preventing complications of diabetes. *Med. J. Aust.* **179**, 498–503 (2003).
105. Acosta, D. *et al.* *Prediabetes y diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico.* (2006).
106. Vaarala, O. Gut and the Induction of Immune Tolerance in Type 1 Diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **15**, 353–361 (1999).
107. Weir, G. C. & Bonner-Weir, S. Islets of Langerhans: the puzzle of intraislet interactions and their relevance to diabetes. *J. Clin. Invest.* **85**, 983 (1990).
108. Kulkarni, R. N. The islet β -cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 365–371 (2004).
109. Tang, S.-C., Chiu, Y.-C., Hsu, C.-T., Peng, S.-J. & Fu, Y.-Y. Plasticity of Schwann cells and pericytes in response to islet injury in mice. *Diabetologia* **56**, 2424–2434 (2013).
110. Ahrén, B. Islet nerves in focus—defining their neurobiological and clinical role. *Diabetologia* **55**, 3152–3154 (2012).
111. Tsui, H., Razavi, R., Chan, Y., Yantha, J. & Dosch, H.-M. ‘Sensing’ autoimmunity in type 1 diabetes. *Trends Mol. Med.* **13**, 405–413 (2007).
112. Faber, C. L., Deem, J. D., Campos, C. A., Taborsky, G. J. & Morton, G. J. CNS control of the endocrine pancreas. *Diabetologia* **63**, 2086–2094 (2020).
113. Norris, J. M., Johnson, R. K. & Stene, L. C. Type 1 diabetes—early life origins and changing epidemiology. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **8**, 226–238 (2020).
114. Redondo, M. J., Steck, A. K. & Pugliese, A. Genetics of type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* **19**, 346–353 (2018).
115. Fløyel, T., Kaur, S. & Pociot, F. Genes Affecting β -Cell Function in Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **15**, 97 (2015).
116. Pearson, J. A., Wong, F. S. & Wen, L. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *J. Autoimmun.* **66**, 76–88 (2016).
117. Olsson, A. H. *et al.* Genome-Wide Associations between Genetic and Epigenetic Variation Influence mRNA Expression and Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. *PLoS Genet.* **10**, e1004735 (2014).
118. Chou, D. H.-C. *et al.* Inhibition of Histone Deacetylase 3 Protects Beta Cells from Cytokine-Induced Apoptosis. *Chem. Biol.* **19**, 669–673 (2012).
119. Christianson, S. W., Shultz, L. D. & Leiter, E. H. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes* **42**, 44–55 (1993).
120. Santamaria, P. The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes. *Immunity* **32**, 437–445 (2010).
121. Marrack, P. & Kappler, J. W. Do MHCII-presented neoantigens drive type 1 diabetes and other autoimmune diseases? *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a007765 (2012).

122. Phillips, J. M. *et al.* Type 1 Diabetes Development Requires Both CD4+ and CD8+ T cells and Can Be Reversed by Non-Depleting Antibodies Targeting Both T Cell Populations. *Rev. Diabet. Stud.* **6**, 97 (2009).
123. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. & Hume, D. A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 163–189 (2004).
124. Viisanen, T. *et al.* Circulating CXCR5+PD-1+ICOS+ Follicular T Helper Cells Are Increased Close to the Diagnosis of Type 1 Diabetes in Children With Multiple Autoantibodies. *Diabetes* **66**, 437–447 (2017).
125. Burrack, A. L., Martinov, T. & Fife, B. T. T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **8**, 343 (2017).
126. Serreze, D. *et al.* B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new “speed congenic” stock of NOD.Ig mu null mice. *J. Exp. Med.* **184**, 2049 (1996).
127. Höglund, P. *et al.* Initiation of Autoimmune Diabetes by Developmentally Regulated Presentation of Islet Cell Antigens in the Pancreatic Lymph Nodes. *J. Exp. Med.* **189**, 331 (1999).
128. Unanue, E. R. Antigen Presentation in the Autoimmune Diabetes of the NOD Mouse. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 579–608 (2014).
129. Vehik, K. *et al.* Development of autoantibodies in the TrialNet natural history study. *Diabetes Care* **34**, 1897–1901 (2011).
130. Noorchashm, H. *et al.* I-Ag7-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice. *undefined* (1999).
131. Lieberman, S. M. & DiLorenzo, T. P. A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *Tissue Antigens* **62**, 359–377 (2003).
132. Tsui, H. *et al.* Islet Glia, Neurons, and β Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1150**, 32–42 (2008).
133. Tsui, H., Winer, S., Jakowsky, G. & Dosch, H.-M. Neuronal Elements in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **4**, 301–310 (2003).
134. Holzmann, B. Modulation of immune responses by the neuropeptide CGRP. *Amino Acids* **45**, 1–7 (2013).
135. Assas, B. M., Pennock, J. I. & Miyan, J. A. Calcitonin gene-related peptide is a key neurotransmitter in the neuro-immune axis. *Front. Neurosci.* **8**, 23 (2014).
136. Caterina, M. J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R64–R76 (2007).
137. Szolcsányi, J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides* **38**, 377–384 (2004).

138. Winston, J. H., He, Z.-J., Shenoy, M., Xiao, S.-Y. & Pasricha, P. J. Molecular and behavioral changes in nociception in a novel rat model of chronic pancreatitis for the study of pain. *Pain* **117**, 214–222 (2005).
139. Gram, D. X. *et al.* Capsaicin-sensitive sensory fibers in the islets of Langerhans contribute to defective insulin secretion in Zucker diabetic rat, an animal model for some aspects of human type 2 diabetes. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 213–223 (2007).
140. O'Connor, T. M. *et al.* The role of substance P in inflammatory disease. *J. Cell. Physiol.* **201**, 167–180 (2004).
141. Persson-Sjögren, S., Lejon, K., Holmberg, D. & Forsgren, S. Expression of the NK-1 receptor on islet cells and invading immune cells in the non-obese diabetic mouse. *J. Autoimmun.* **24**, 269–279 (2005).
142. Razavi, R. *et al.* TRPV1+ Sensory Neurons Control β Cell Stress and Islet Inflammation in Autoimmune Diabetes. *Cell* **127**, 1123–1135 (2006).
143. Sadeh, M. *et al.* Association of the M315I Variant in the Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor-1 (TRPV1) gene with Type 1 Diabetes in an Ashkenazi Jewish Population. *IAMJ* **15**, 477–480 (2013).
144. Atkinson, M. A. & Leiter, E. H. The NOD mouse model of type 1 diabetes: As good as it gets? *Nature Medicine* **5**, 601–604 (1999).
145. André, I. *et al.* Checkpoints in the progression of autoimmune disease: Lessons from diabetes models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 2260–2263 (1996).
146. Rees, D. A. & Alcolado, J. C. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* **22**, 359–370 (2005).
147. Bach, J.-F. The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. *N. Engl. J. Med.* **347**, 911–920 (2002).
148. Söderström, I. *et al.* Establishment and characterization of RAG-2 deficient non-obese diabetic mice. *Scand. J. Immunol.* **43**, 525–530 (1996).
149. Koebel, C. M. *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* **450**, 903–907 (2007).
150. Burnet, F. M. The Concept of Immunological Surveillance. **13**, 1–27 (Karger Publishers, 1970).
151. Mortaz, E. *et al.* Cancers related to immunodeficiencies: Update and perspectives. *Frontiers in Immunology* **7**, 365 (2016).
152. Galon, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**, 1960–1964 (2006).
153. Schupp, J. *et al.* Targeting myeloid cells in the tumor sustaining microenvironment. *Cellular Immunology* **343**, 103713 (2019).
154. Bonmort, M., Dalod, M., Ullrich, E., Chaput, N. & Zitvogel, L. Killer dendritic cells : IKDC and the others. *Current Opinion in Immunology* **20**, 558–565 (2008).

155. Huang, J., Tatsumi, T., Pizzoferrato, E., Vujanovic, N. & Storkus, W. J. Nitric oxide sensitizes tumor cells to dendritic cell-mediated apoptosis, uptake, and cross-presentation. *Cancer Res.* **65**, 8461–8470 (2005).
156. Taieb, J. *et al.* A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat. Med.* **12**, 214–219 (2006).
157. Chan, C. W. *et al.* Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat. Med.* **12**, 207–213 (2006).
158. Valilou, S. F. & Rezaei, N. Tumor Antigens. *Vaccines for Cancer Immunotherapy: An Evidence-Based Review on Current Status and Future Perspectives*. 61–74 (Elsevier, 2018).
159. Tagliamonte, M., Petrizzo, A., Tornesello, M. L., Buonaguro, F. M. & Buonaguro, L. Antigen-specific vaccines for cancer treatment. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 3332–3346 (2014).
160. Zhao, Y. *et al.* Cancer vaccines: Antigen selection strategy. *Vaccines* **9**, 1–30 (2021).
161. Butterfield, L. H. Cancer vaccines. *BMJ* **350**, h988 (2015).
162. Bright, R. K., Bright, J. D. & Byrne, J. A. Overexpressed oncogenic tumor-self antigens. *Hum. Vaccines Immunother.* **10**, 3297–3305 (2014).
163. Hodi, F. S. Well-defined melanoma antigens as progression markers for melanoma: Insights into differential expression and host response based on stage. *Clin. Cancer Res.* **12**, 673–678 (2006).
164. Barrow, C. *et al.* Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin. Cancer Res.* **12**, 764–771 (2006).
165. Ordóñez, N. G. Value of melanocytic-associated immunohistochemical markers in the diagnosis of malignant melanoma: A review and update. *Hum. Pathol.* **45**, 191–205 (2014).
166. Heo, C. K., Bahk, Y. Y. & Cho, E. W. Tumor-associated autoantibodies as diagnostic and prognostic biomarkers. *BMB Reports* **45**, 677–685 (2012).
167. Vinay, D. S. *et al.* Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biol.* **35**, S185–S198 (2015).
168. Velcheti, V. & Schalper, K. Basic Overview of Current Immunotherapy Approaches in Cancer. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* **35**, 298–308 (2016).
169. Zhang, Y. & Zhang, Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular and Molecular Immunology.* **17**, 807–821 (2020).
170. Kimiz-Gebologlu, I., Gulce-Iz, S. & Biray-Avci, C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol. Biol. Rep.* **45**, 2935–2940 (2018).
171. Mastelic-Gavillet, B., Balint, K., Boudousquie, C., Gannon, P. O. & Kandalaft, L. E. Personalized dendritic cell vaccines-recent breakthroughs and encouraging clinical results. *Frontiers in Immunology* **10**, 766 (2019).

172. Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M. J. & Kroemer, G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nature Reviews Immunology* **15**, 405–414 (2015).
173. Mayor, M., Yang, N., Sterman, D., Jones, D. R. & Adusumilli, P. S. Immunotherapy for non-small cell lung cancer: current concepts and clinical trials. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* **49**, 1324–1333 (2016).
174. Neves, H. & Kwok, H. F. Recent advances in the field of anti-cancer immunotherapy. *BBA Clinical* **3**, 280–288 (2015).
175. Rosenberg, S. A. *et al.* Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **319**, 1676–1680 (1988).
176. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* **12**, 252–264 (2012).
177. Seidel, J. A., Otsuka, A. & Kabashima, K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: Mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Frontiers in Oncology* **8**, 86 (2018).
178. Ruoslahti, E. Tumor penetrating peptides for improved drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **110–111**, 3–12 (2017).
179. Leng, Q., Woodle, M. C. & Mixson, A. J. NRP1 transport of cancer therapeutics mediated by tumor-penetrating peptides. *Drugs Future* **42**, 95–104 (2017).
180. Zuo, H. IRGD: A Promising Peptide for Cancer Imaging and a Potential Therapeutic Agent for Various Cancers. *J. Oncol.* **2019**, (2019).
181. Miura, Y. *et al.* Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. *ACS Nano* **7**, 8583–8592 (2013).
182. Lu, L. *et al.* An iRGD-conjugated prodrug micelle with blood-brain-barrier penetrability for anti-glioma therapy. *Biomaterials* **230**, 119666 (2020).
183. Wang, K. *et al.* Tumor penetrability and anti-angiogenesis using iRGD-mediated delivery of doxorubicin-polymer conjugates. *Biomaterials* **35**, 8735–8747 (2014).
184. Zhang, Q. *et al.* A novel strategy to improve the therapeutic efficacy of Gemcitabine for non-small cell lung cancer by the tumor-penetrating peptide iRGD. *PLoS One* **10**, e0129865 (2015).
185. Moreno-Manzano, V., Lucio-Cazana, J., Konta, T., Nakayama, K. & Kitamura, M. Enhancement of TNF- α -induced apoptosis by immobilized arginine-glycine-aspartate: Involvement of a tyrosine kinase-dependent, MAP kinase-independent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 293–298 (2000).
186. Zhang, Y. *et al.* Tumor-penetration and antitumor efficacy of cetuximab are enhanced by co-administered irgd in a murine model of human NSCLC. *Oncol. Lett.* **12**, 3241–3249 (2016).
187. Zhu, A. *et al.* Bispecific tumor-penetrating protein anti-EGFR-iRGD efficiently enhances the infiltration of lymphocytes in gastric cancer. *Am. J. Cancer Res.* **8**, 91–105 (2018).

188. Hu, H. *et al.* iRGD-paclitaxel conjugate nanoparticles for targeted paclitaxel delivery. *Drug Dev. Res.* **80**, 1080–1088 (2019).
189. Mamnoon, B. *et al.* Targeted Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Hypoxic, Triple-Negative Breast Tumors. *ACS Appl. Bio Mater.* **4**, 1450–1460 (2021).
190. Kettelhut, B. V. & Metcalfe, D. D. Pediatric mastocytosis. *J. Invest. Dermatol.* **96**, (1991).
191. Longley, B. J. *et al.* Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: Establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat. Genet.* **12**, 312–314 (1996).
192. Ma, D., Stence, A. A., Bossler, A. B., Hackman, J. R. & Bellizzi, A. M. Identification of KIT activating mutations in paediatric solitary mastocytoma. *Histopathology* **64**, 218–225 (2014).
193. Uyttenhove, C. *et al.* The expression of mouse gene P1A in testis does not prevent safe induction of cytolytic T cells against a P1A-encoded tumor antigen. *Int. J. Cancer* **70**, 349–356 (1997).
194. Rosato, A., Milan, G., Collavo, D. & Zanovello, P. DNA-Based Vaccination against Tumors Expressing the P1A Antigen. *Methods* **19**, 187–190 (1999).
195. Miller, A. J. & Mihm, M. C. Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **355**, 51–65 (2006).
196. Restrepo, C. & Velásquez, M. M. Mecanismos de patogenésis del melanoma maligno. *Rev Asoc Colomb Dermatol* **20**, 161–172 (2012).
197. Collins, L., Quinn, A. & Stasko, T. Skin Cancer and Immunosuppression. *Dermatol. Clin.* **37**, 83–94 (2019).
198. Amin, M. B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalised" approach to cancer staging. *CA: a cancer journal for clinicians.* **67**, 93-99 (2017).
199. Gershenwald, J. E. *et al.* Multi-Institutional Melanoma Lymphatic Mapping Experience: The Prognostic Value of Sentinel Lymph Node Status in 612 Stage I or II Melanoma Patients. *J. Clin. Oncol.* **17**, 976–976 (1999).
200. Morton, D. L. Technical Details of Intraoperative Lymphatic Mapping for Early Stage Melanoma. *Arch. Surg.* **127**, 392 (1992).
201. Reintgen, D. *et al.* The Orderly Progression of Melanoma Nodal Metastases. *Ann. Surg.* **220**, 759–767 (1994).
202. Thompson, J. F. *et al.* Sentinel lymph node status as an indicator of the presence of metastatic melanoma in regional lymph nodes. *Melanoma Res.* **5**, 255–260 (1995).
203. Uren, R. F. *et al.* Lymphoscintigraphy to identify sentinel lymph nodes in patients with melanoma. *Melanoma Res.* **4**, 395–399 (1994).
204. Bostick, P. Comparison of Blue Dye and Probe-Assisted Intraoperative Lymphatic Mapping in Melanoma to Identify Sentinel Nodes in 100 Lymphatic Basins. *Arch. Surg.* **134**, 43 (1999).

205. Andtbacka, R. H. I. *et al.* Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2780–2788 (2015).
206. Rosenberg, S. A. & White, D. E. Vitiligo in patients with melanoma: Normal tissue antigens can be targets for cancer immunotherapy. *J. Immunother.* **19**, 81–84 (1996).
207. Kamiya, H., Zhang, W. & Sima, A. A. F. Degeneration of the Golgi and neuronal loss in dorsal root ganglia in diabetic BioBreeding/Worcester rats. *Diabetologia* **49**, 2763–2774 (2006).
208. Arpa, B. Estudi de la implicació del Sistema Nerviós Perifèric i de la resposta autoimmunitària dels limfòcits B anti-periferina en el decurs de la Diabetis Mellitus Tipus 1 en el model NOD. (Universitat de Lleida, 2014).
209. Calderó, J. *et al.* Lithium prevents excitotoxic cell death of motoneurons in organotypic slice cultures of spinal cord. *Neuroscience* **165**, 1353–1369 (2010).
210. Puertas, M. C. *et al.* Phenotype and functional characteristics of islet-infiltrating B-cells suggest the existence of immune regulatory mechanisms in islet milieu. *Diabetes* **56**, 940–9 (2007).
211. Carrillo, J. *et al.* Islet-infiltrating B-cells in nonobese diabetic mice predominantly target nervous system elements. *Diabetes* **54**, 69–77 (2005).
212. Puertas, M. C. *et al.* Peripherin Is a Relevant Neuroendocrine Autoantigen Recognized by Islet-Infiltrating B Lymphocytes. *J. Immunol.* **178**, 6533–6539 (2007).
213. Tisch, R. *et al.* Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* **366**, 72–75 (1993).
214. Pléau, J.-M., Marche, P. N., Serrano, M.-P. I., Boitard, C. & Bach, J.-F. Evidence for antigen driven selection in two monoclonal auto-antibodies derived from nonobese diabetic mice. *Mol. Immunol.* **30**, 1257–1264 (1993).
215. Strom, A. *et al.* Peripherin-reactive antibodies in mouse, rabbit and human blood. *J. Proteome Res.* **9**, 1203–1208 (2010).
216. Egia-Mendikute, L. La importancia de la periferina como autoantígeno en la Diabetes tipo 1 y su papel como DAMP. (Universitat de Lleida, 2019).
217. Qiao, R., Wang, K. & Zhong, J. Tumor-penetrating peptides. Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering (Elsevier Ltd, 2018).
218. Chan, E. K. L. *et al.* Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns (ICAP) 2014-2015. *Front. Immunol.* **6**, 412 (2015).
219. Fuchs, E. & Cleveland, D. W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279**, 514–519 (1998).
220. Herrmann, H., Strelkov, S. V, Burkhard, P. & Aebi, U. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J. Clin. Invest.* **119**, 1772–1783 (2009).
221. Bour-Jordan, H. & Bluestone, J. A. Sensory Neurons Link the Nervous System and Autoimmune Diabetes. *Cell* **127**, 1097–1099 (2006).

222. Nilsson, P. & Saido, T. C. Dual roles for autophagy: Degradation and secretion of Alzheimer's disease A β peptide. *BioEssays* **36**, 570–578 (2014).
223. Alafuzoff, I. & Parkkinen, L. Staged pathology in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **20**, S57–S61 (2014).
224. Kim, S. & Kim, K.-T. Therapeutic Approaches for Inhibition of Protein Aggregation in Huntington's Disease. *Exp. Neurobiol.* **23**, 36–44 (2014).
225. Ogawa, M. & Furukawa, Y. A seeded propagation of Cu, Zn-superoxide dismutase aggregates in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 83 (2014).
226. Nixon, R. A., Yang, D.-S. & Lee, J.-H. Neurodegenerative lysosomal disorders: A continuum from development to late age. *Autophagy* **4**, 590–599 (2008).
227. Shambharkar, P. B. *et al.* TMEM203 Is a Novel Regulator of Intracellular Calcium Homeostasis and Is Required for Spermatogenesis. *PLoS One* **10**, e0127480 (2015).
228. Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R. J. & Blumberg, R. S. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology* **16**, 469–484 (2016).
229. Hetz, C., Zhang, K. & Kaufman, R. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **21**, 421–438 (2020).
230. Engin, F. ER stress and development of type 1 diabetes. *J. Investig. Med.* **64**, 2–6 (2016).
231. Mehrtash, A. B. & Hochstrasser, M. Ubiquitin-dependent protein degradation at the endoplasmic reticulum and nuclear envelope. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **93**, 111–124 (2019).
232. Meyer, H., Bug, M. & Bremer, S. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat. Cell Biol.* **14**, 117–123 (2012).
233. Boding, L. *et al.* Midline 1 directs lytic granule exocytosis and cytotoxicity of mouse killer T cells. *Eur. J. Immunol.* **44**, 3109–3118 (2014).
234. Collison, A. *et al.* The E3 ubiquitin ligase midline 1 promotes allergen and rhinovirus-induced asthma by inhibiting protein phosphatase 2A activity. *Nat. Med.* **19**, 232–237 (2013).
235. Okai, T. *et al.* Novel small GTPase subfamily capable of associating with tubulin is required for chromosome segregation. *J. Cell Sci.* **117**, 4705–4715 (2004).
236. Sondermann, J. R. *et al.* Vti1b promotes TRPV1 sensitization during inflammatory pain. *Pain* **160**, 508–527 (2019).
237. Taupenot, L., Harper, K. L. & O'Connor, D. T. The Chromogranin–Secretogranin Family. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1134–1149 (2003).
238. Shooshtarizadeh, P. *et al.* The antimicrobial peptides derived from chromogranin/secretogranin family, new actors of innate immunity. *Regul. Pept.* **165**, 102–110 (2010).

239. Bartolomucci, A., Pasinetti, G. M. & Salton, S. R. J. Granins as disease-biomarkers: translational potential for psychiatric and neurological disorders. *Neuroscience* **170**, 289–297 (2010).
240. Bartolomucci, A. *et al.* The Extended Granin Family: Structure, Function, and Biomedical Implications. *Endocr. Rev.* **32**, 755 (2011).
241. Burbelo, P. D. *et al.* Extraprostatic autoantibody profiles in type I diabetes. *PLoS One* **7**, e45216 (2012).
242. Tsui, H. *et al.* Targeting of pancreatic glia in type 1 diabetes. *Diabetes* **57**, 918–928 (2008).
243. Schmitt, E., Gehrman, M., Brunet, M., Multhoff, G. & Garrido, C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 15–27 (2007).
244. Ruseska, I. & Zimmer, A. Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. *Beilstein J. Nanotechnol.* **11**, 101–123 (2020).
245. Wang, L., Wen, M. & Cao, X. Nuclear hnRNP A2B1 initiates and amplifies the innate immune response to DNA viruses. *Science*. **365**, eaav0758 (2019).
246. Lin, H. & Cao, X. Nuclear innate sensors for nucleic acids in immunity and inflammation. *Immunological Reviews* **297**, 162–173 (2020).
247. Dudek-Perić, A. M. *et al.* Antitumor immunity triggered by melphalan is potentiated by melanoma cell surface-associated calreticulin. *Cancer Res.* **75**, 1603–1614 (2015).
248. Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. & Kroemer, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Reviews Immunology* **8**, 59–73 (2008).
249. Ding, Z.-C., Munn, D. H. & Zhou, G. Chemotherapy-induced myeloid suppressor cells and antitumor immunity: The Janus face of chemotherapy in immunomodulation. *Oncoimmunology* **3**, e954471 (2014).
250. Casares, N. *et al.* Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med.* **202**, 1691–1701 (2005).
251. Pruneri, G. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are a powerful prognostic marker in patients with triple-negative breast cancer enrolled in the IBCSG phase III randomized clinical trial 22-00. *Breast Cancer Res. Treat.* **158**, 323–331 (2016).
252. Lake, R. A. & Robinson, B. W. S. Immunotherapy and chemotherapy - A practical partnership. *Nature Reviews Cancer* **5**, 397–405 (2005).
253. Chang, C. L. *et al.* Dose-dense chemotherapy improves mechanisms of antitumor immune response. *Cancer Res.* **73**, 119–127 (2013).
254. Kang, S., Lee, S. & Park, S. iRGD peptide as a tumor-penetrating enhancer for tumor-targeted drug delivery. *Polymers* **12**, 1906 (2020).
255. Diao, L. & Meibohm, B. Pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides. *Clinical Pharmacokinetics* **52**, 855–868 (2013).

256. Vizán, P., Di Croce, L. & Aranda, S. Functional and Pathological Roles of AHCY. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 654344 (2021).
257. Bardag-Gorce, F. & French, S. W. Delta-aminolevulinic dehydratase is a proteasome interacting protein. *Exp. Mol. Pathol.* **91**, 485–489 (2011).
258. Emanuelli, T. *et al.* Intrastratial administration of 5-aminolevulinic acid induces convulsions and body asymmetry through glutamatergic mechanisms. *Brain Res.* **868**, 88–94 (2000).
259. Demasi, M., Penatti, C. A. A., DeLucia, R. & Bechara, E. J. H. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: Implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 291–299 (1996).
260. Hofmann, I. & Munro, S. An N-terminally acetylated Arf-like GTPase is localised to lysosomes and affects their motility. *J. Cell Sci.* **119**, 1494–1503 (2006).
261. He, C. X., Avner, P., Boitard, C. & Rogner, U. C. Downregulation of the circadian rhythm related gene *Arntl2* suppresses diabetes protection in *Idd6* NOD.C3H congenic mice. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **37**, 1154–1158 (2010).
262. Lebailly, B., He, C. & Rogner, U. C. Linking the circadian rhythm gene *Arntl2* to interleukin 21 expression in type 1 diabetes. *Diabetes* **63**, 2148–2157 (2014).
263. Angelousi, A. *et al.* Clock genes alterations and endocrine disorders. *European Journal of Clinical Investigation* **48**, e12927 (2018).
264. Yasuda, T. *et al.* Chemokines CCL19 and CCL21 promote activation-induced cell death of antigen-responding T cells. *Blood* **109**, 449–457 (2008).
265. Hauser, M. A. & Legler, D. F. Common and biased signaling pathways of the chemokine receptor CCR7 elicited by its ligands CCL19 and CCL21 in leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 869–882 (2016).
266. Van Damme, J. *et al.* Granulocyte chemotactic protein-2 and related CXC chemokines: from gene regulation to receptor usage. *J. Leukoc. Biol.* **62**, 563–569 (1997).
267. Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S. & Sawaya, B. E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interf. Cytokine Res.* **29**, 313–326 (2009).
268. Gschwandtner, M., Derler, R. & Midwood, K. S. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Frontiers in Immunology* **10**, 2759 (2019).
269. Lynn, K. S., Peterson, R. J. & Koval, M. Ruffles and spikes: Control of tight junction morphology and permeability by claudins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1862**, 183339 (2020).
270. Hallen, A., Cooper, A. J. L., Jamie, J. F., Haynes, P. A. & Willows, R. D. Mammalian forebrain ketimine reductase identified as μ -crystallin; Potential regulation by thyroid hormones. *J. Neurochem.* **118**, 379–387 (2011).

271. Hallen, A., Cooper, A. J. L., Jamie, J. F. & Karuso, P. Insights into Enzyme Catalysis and Thyroid Hormone Regulation of Cerebral Ketimine Reductase/ μ -Crystallin Under Physiological Conditions. *Neurochem. Res.* **40**, 1252–1266 (2015).
272. Cornwall, G. A. & Hsia, N. A new subgroup of the family 2 cystatins. *Mol. Cell. Endocrinol.* **200**, 1–8 (2003).
273. Fasken, M. B. *et al.* The RNA Exosome and Human Disease. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2062**, 3–33 (2020).
274. Gu, Y. *et al.* Deficiency of monoclonal non-specific suppressor factor beta (MNSFB) promotes pregnancy loss in mice. *Mol. Reprod. Dev.* **82**, 475–488 (2015).
275. Gizak, A., Duda, P., Wisniewski, J. & Rakus, D. Fructose-1,6-bisphosphatase: From a glucose metabolism enzyme to multifaceted regulator of a cell fate. *Advances in Biological Regulation* **72**, 41–50 (2019).
276. Olsen, R. W. GABAA receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology* **136**, 10–22 (2018).
277. Mulligan, M. K. *et al.* Identification of a functional non-coding variant in the GABAA receptor $\alpha 2$ subunit of the C57BL/6J mouse reference genome: Major implications for neuroscience research. *Front. Genet.* **10**, 188 (2019).
278. Tudeau, L. *et al.* Mice lacking spinal $\alpha 2$ GABAA receptors: Altered GABAergic neurotransmission, diminished GABAergic antihyperalgesia, and potential compensatory mechanisms preventing a hyperalgesic phenotype. *Brain Res.* **1741**, 146889 (2020).
279. Arreola, R., Valderrama, B., Morante, M. L. & Horjales, E. Two mammalian glucosamine-6-phosphate deaminases: a structural and genetic study. *FEBS Lett.* **551**, 63–70 (2003).
280. Hughes, M. M. *et al.* Glutathione Transferase Omega-1 Regulates NLRP3 Inflammasome Activation through NEK7 Deglutathionylation. *Cell Rep.* **29**, 151-161.e5 (2019).
281. Menon, D. & Board, P. G. A role for glutathione transferase omega 1 (GSTO1-1) in the glutathionylation cycle. *J. Biol. Chem.* **288**, 25769–25779 (2013).
282. Menon, D. *et al.* GSTO1-1 plays a pro-inflammatory role in models of inflammation, colitis and obesity. *Sci. Rep.* **7**, 17832 (2017).
283. Adams, E. J., Chien, Y. & Garcia, K. C. Structure of a gd T Cell Receptor in Complex with the Nonclassical MHC T22. *Science.* **308**, 227–231 (2005).
284. Conerly, M. L. *et al.* Changes in H2A.Z occupancy and DNA methylation during B-cell lymphomagenesis. *Genome Res.* **10**, 1383–1390 (2010).
285. Bargaje, R. *et al.* Proximity of H2A.Z containing nucleosome to the transcription start site influences gene expression levels in the mammalian liver and brain. *Nucleic Acids Res.* **40**, 8965–8978 (2012).
286. Ding, C. K. C. *et al.* MESH1 is a cytosolic NADPH phosphatase that regulates ferroptosis. *Nat. Metab.* **2**, 270–277 (2020).

287. Fernandez-Capetillo, O., Allis, C. D. & Nussenzweig, A. Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. *J Exp Med* **199**, 1671–1677 (2004).
288. Barnhart, M. C. *et al.* HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore. *J. Cell Biol.* **194**, 229–243 (2011).
289. Chaperonin, M. M. *et al.* Cloning , Expression , and Purification of a Functional Nonacetylated. *J. Biol. Chem.* **269**, 26858–26864 (1994).
290. Czarnecka, A. M., Campanella, C., Zummo, G. & Cappello, F. Heat shock protein 10 and signal transduction: a ‘capsula eburnea’ of carcinogenesis? *Cell Stress Chaperones* **11**, 287–294 (2006).
291. Dobocan, M. C., Sadvakassova, G. & Congote, L. F. Chaperonin 10 as an Endothelial- Derived Differentiation Factor : Role of Glycogen Synthase Kinase-3. *J. Cell. Physiol.* **219**, 470–476 (2009).
292. Van Pesch, V. & Michiels, T. Characterization of Interferon- γ 13, a Novel Constitutive Murine Interferon- γ Subtype. *J. Biol. Chem.* **278**, 46321–46328 (2003).
293. Fukagawa, T. & Earnshaw, W. C. The centromere: Chromatin foundation for the kinetochore machinery. *Developmental Cell* **30**, 496–508 (2014).
294. Verdaasdonk, J. S. & Bloom, K. Centromeres: Unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 320–332 (2011).
295. Okumura, K. *et al.* CENP-R acts bilaterally as a tumor suppressor and as an oncogene in the two-stage skin carcinogenesis model. *Cancer Sci.* **108**, 2142–2148 (2017).
296. Zhu, Y. *et al.* The influence of Chm-I knockout on ectopic cartilage regeneration and homeostasis maintenance. *Tissue Eng. - Part A* **21**, 782–792 (2015).
297. Schultz, T. E. & Blumenthal, A. The RP105/MD-1 complex: molecular signaling mechanisms and pathophysiological implications. *J. Leukoc. Biol.* **101**, 183–192 (2017).
298. Itoh, Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* **44–46**, 207–223 (2015).
299. Soria-Valles, C. *et al.* MMP-25 Metalloprotease Regulates Innate Immune Response through NF- κ B Signaling. *J. Immunol.* **197**, 296–302 (2016).
300. Guan, Y. *et al.* Mas-related G-protein-coupled receptors inhibit pathological pain in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15933–15938 (2010).
301. Bader, M., Alenina, N., Andrade-Navarro, M. A. & Santos, R. A. Mas and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. *Pharmacol. Rev.* **66**, 1080–1105 (2014).
302. Saiyasit, N., Srietchwande, J., Chattipakorn, N. & Chattipakorn, S. C. Potential roles of neurotensin on cognition in conditions of obese-insulin resistance. *Neuropeptides* **72**, 12–22 (2018).
303. Zhang, X. & Firestein, S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat. Neurosci.* **5**, 124–133 (2002).

304. Kawai, S., Abiko, Y. & Amano, A. Odd-skipped related 2 regulates genes related to proliferation and development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, 184–190 (2010).
305. Kawai, S., Michikami, I., Kitagaki, J., Hashino, E. & Amano, A. Expression pattern of zinc-finger transcription factor Odd-skipped related 2 in murine development and neonatal stage. *Gene Expr. Patterns* **13**, 372–376 (2013).
306. Kukkola, L., Hieta, R., Kivirikko, K. I. & Myllyharju, J. Identification and Characterization of a Third Human, Rat, and Mouse Collagen Prolyl 4-Hydroxylase Isoenzyme. *J. Biol. Chem.* **278**, 47685–47693 (2003).
307. Di Bartolomeo, F., Wagner, A. & Daum, G. Cell biology, physiology and enzymology of phosphatidylserine decarboxylase. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1862**, 25–38 (2017).
308. Ohto, T., Uozumi, N., Hirabayashi, T. & Shimizu, T. Identification of novel cytosolic phospholipase A2s, murine cPLA₂δ, ε, and ζ, which form a gene cluster with cPLA₂β. *J. Biol. Chem.* **280**, 24576–24583 (2005).
309. Moktan, H. *et al.* Solution structure and DNA-binding properties of the winged helix domain of the meiotic recombination HOP2 protein. *J. Biol. Chem.* **289**, 14682–14691 (2014).
310. Moreno-Mateos, M. a. *et al.* PTTG1/securin modulates microtubule nucleation and cell migration. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4302–4311 (2011).
311. Hatcher, R. J. *et al.* Pttg1/securin is required for the branching morphogenesis of the mammary gland and suppresses mammary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 1008–13 (2014).
312. Lee, H. J. *et al.* Changes in PTTG1 by human TERT gene expression modulate the self-renewal of placenta-derived mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* **357**, 145–157 (2014).
313. Wool, I. G., Chan, Y. L. & Glück, A. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochemistry and cell biology* **73**, 933–947 (1995).
314. Wang, J., Dupuis, C., Tying, S. K. & Underbrink, M. P. Sterile α Motif Domain Containing 9 Is a Novel Cellular Interacting Partner to Low-Risk Type Human Papillomavirus E6 Proteins. *PLoS One* **11**, e0149859 (2016).
315. Na, B. R. *et al.* TAGLN2 regulates T cell activation by stabilizing the actin cytoskeleton at the immunological synapse. *J. Cell Biol.* **209**, 143–162 (2015).
316. Mohan, R. D., Litchfield, D. W., Torchia, J. & Tini, M. Opposing regulatory roles of phosphorylation and acetylation in DNA mismatch processing by thymine DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1135–1148 (2010).
317. Eckert, R. L. *et al.* Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol. Rev.* **94**, 383–417 (2014).

**ARTICLES
RELACIONATS**

Degut a l'estudi de patentabilitat al que es troben sotmesos part dels resultats de la present tesi, encara no s'ha publicat cap article derivat d'aquesta.

Tot i així, malgrat el següent article no és fruit de l'estudi dut a terme en la present tesi, sí que forma part de la feina realitzada durant la formació doctoral. És per això que s'afegeix a continuació.



B-Lymphocyte Phenotype Determines T-Lymphocyte Subset Differentiation in Autoimmune Diabetes

OPEN ACCESS

Edited by:

Urs Christen,
Goethe University Frankfurt, Germany

Reviewed by:

Ezio Bonifacio,
Dresden University of
Technology, Germany
Kathryn Haskins,
University of Colorado Denver,
United States
Thomas William Kay,
St. Vincents Institute of Medical
Research, Australia

*Correspondence:

David Serreze
dave.serreze@jax.org
Joan Verdaguer
joan.verdaguer@mex.udl.cat

†These authors share first authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Autoimmune and Autoinflammatory
Disorders,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 28 December 2018

Accepted: 09 July 2019

Published: 25 July 2019

Citation:

Egia-Mendikute L, Arpa B,
Rosell-Mases E, Corral-Pujol M,
Carrascal J, Carrillo J, Mora C,
Chapman H, Panosa A, Vives-Pi M,
Stratmann T, Serreze D and
Verdaguer J (2019) B-Lymphocyte
Phenotype Determines T-Lymphocyte
Subset Differentiation in Autoimmune
Diabetes. *Front. Immunol.* 10:1732.
doi: 10.3389/fimmu.2019.01732

Leire Egia-Mendikute^{1†}, Berta Arpa^{1†}, Estela Rosell-Mases¹, Marta Corral-Pujol¹, Jorge Carrascal¹, Jorge Carrillo¹, Conchi Mora¹, Harold Chapman², Anaïs Panosa³, Marta Vives-Pi^{4,5}, Thomas Stratmann⁶, David Serreze^{2*} and Joan Verdaguer^{1,5*}

¹ Immunology Unit, Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, IRBLleida, University of Lleida, Lleida, Spain,

² The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, United States, ³ Microscopy and Flow Cytometry Facility, IRBLleida, Universitat de Lleida, Lleida, Spain, ⁴ Immunology Section, Germans Trias i Pujol Research Institute, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain, ⁵ CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain,

⁶ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Previous studies indicate that B-lymphocytes play a key role activating diabetogenic T-lymphocytes during the development of autoimmune diabetes. Recently, two transgenic NOD mouse models were generated: the NOD-*Perlg* and the 116C-NOD mice. In NOD-*Perlg* mice, B-lymphocytes acquire an activated proliferative phenotype and support accelerated autoimmune diabetes development. In contrast, in 116C-NOD mice, B-lymphocytes display an anergic-like phenotype delaying autoimmune diabetes onset and decreasing disease incidence. The present study further evaluates the T- and B-lymphocyte phenotype in both models. In islet-infiltrating B-lymphocytes (IIBLs) from 116C-NOD mice, the expression of H2-K^d and H2-A^{g7} is decreased, whereas that of BAFF, BAFF-R, and TACI is increased. In contrast, IIBLs from NOD-*Perlg* show an increase in CD86 and FAS expression. In addition, islet-infiltrating T-lymphocytes (IITLs) from NOD-*Perlg* mice exhibit an increase in PD-1 expression. Moreover, proliferation assays indicate a high capacity of B-lymphocytes from NOD-*Perlg* mice to secrete high amounts of cytokines and induce T-lymphocyte activation compared to 116C B-lymphocytes. This functional variability between 116C and *Perlg* B-lymphocytes ultimately results in differences in the ability to shape T-lymphocyte phenotype. These results support the role of B-lymphocytes as key regulators of T-lymphocytes in autoimmune diabetes and provide essential information on the phenotypic characteristics of the T- and B-lymphocytes involved in the autoimmune response in autoimmune diabetes.

Keywords: type 1 diabetes, NOD mouse, transgenic mouse model, B-lymphocyte phenotype, T-lymphocyte phenotype

INTRODUCTION

CD4+ and CD8+ T-lymphocytes are considered to be the major effectors of β -cell damage during the development of autoimmune diabetes in both NOD mice and humans. However, T-lymphocytes require the intervention of antigen presenting cells (APCs), such as B-lymphocytes, which drive and modulate their response. The involvement of B-lymphocytes in autoimmune diabetes development was proved when disease protection was observed in NOD mice after introducing the *Ig μ ^{null}* mutation or after anti-B lymphocyte antibody treatments (1–8). Further studies indicated that B-lymphocytes promote autoimmune diabetes development through their APC function activating β -cell-reactive cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) (9, 10). In parallel to this diabetogenic role, a protective effect of some B-lymphocytes on autoimmunity through a potential regulator/suppressor mechanism has been described. Adoptive transfer of LPS-activated splenic B-lymphocytes protects prediabetic NOD female mice from disease development by triggering the apoptosis of β -cell-reactive CTLs or/and inhibiting APC activity (11).

Two transgenic NOD mouse models, the 116C-NOD and the NOD-*PerIg* mice (12, 13), have been recently generated to analyze the natural B-lymphocyte immune response during autoimmune diabetes development. On the one hand, the 116C-NOD mouse model expresses the Ig genes from an islet-infiltrating B lymphocyte of a diabetes resistant but insulin prone (8.3-NODxNOR)F1 mouse with pancreatic islet β -cell specificity (14). Autoimmune diabetes incidence is decreased in 116C-NOD mice compared to NOD mice (**Supplementary Figure 1**). B-lymphocytes from 116C-NOD mice display an anergic-like phenotype but retain the ability to express some co-stimulatory molecules after activation and induce a T cell shift toward a Th17 phenotype. On the other hand, the NOD-*PerIg* mouse expresses a representative Ig of a large proportion of naturally occurring islet-infiltrating B-lymphocytes in NOD mice recognizing the neuronal antigen peripherin (14, 15). In contrast to 116C-NOD, B-lymphocytes from NOD-*PerIg* mice acquire an activated proliferative phenotype and promote an accelerated autoimmune diabetes development (**Supplementary Figure 1**). Despite the differences observed in autoimmune diabetes development, B-lymphocytes from 116C-NOD and NOD-*PerIg* still share certain phenotypic and functional similarities, such as an enlargement of the marginal zone B-lymphocyte subset, and stimulation-induced cytokine production. Thus, the present study aims at studying in depth the functional and phenotypic differences between T- and B-lymphocytes in both mouse models, to better understand the mechanisms underlying the function of both cell populations in inhibiting or accelerating autoimmune diabetes development. The results reveal variations in cytokine production and expression of MHC, as well as costimulatory and inhibitory molecules in T- and B-lymphocytes between both mouse models that consistently result in differences in their ability to modulate T-lymphocyte responses. The results also highlight the capacity of B-lymphocytes to shape T-lymphocyte phenotypes and show that T- and B-lymphocytes of both transgenic mice exert disparate

effect or functions, thus indicating why the development of the disease in both mice models is so different.

MATERIALS AND METHODS

Mice

NOD, NOD-*PerIg*, and 116C-NOD mice were maintained by brother-sister mating under specific pathogen-free conditions at the University of Lleida. This study was carried out in accordance with the principles of the Basel Declaration and recommendations of the Catalan Government (*Generalitat de Catalunya*) concerning the protection of animals for experimentation. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Research in Animal Experimentation of the University of Lleida, Spain. Protocol #: CEEA 02-04/16.

Diabetes Incidence

Mice were checked weekly for glycosuria with Glucocard strips (Meranini, Barcelona, Spain). After two positive readings (>3+) and with a confirmation of glucose levels on blood (higher values than 250 mg/dL), mice were considered diabetic.

Flow Cytometry

Splenocytes and islet-infiltrating leukocytes from 6-week-old female NOD, 116C-NOD and NOD-*PerIg* mice were obtained as described elsewhere (16) and then analyzed by flow cytometry using FACS CANTO II instrumentation (BD, Biosciences, San Jose, CA) and Flowjo (version 8.7) software [see also **Supplementary Figure 2** for histogram analysis for fluorescence minus one (FMO) control of each staining and for a representative analysis of transcription factor expression in CD4+ T lymphocytes]. CD19-V450 (75-0193-U100) was obtained from Tonbo Biosciences (San Diego, CA). CD3-FITC (561798), CD40-Biotin (553789), CD8-Biotin (553033), CD4-PerCp (553052), CD279-APC (562584), CD274-PacificBlue (564715), CD86-PE (561963), CD80-Biotin (09602D), I-Ak-Biotin (553539) which cross-reacts with I-Ag7, H-2K^d-Biotin (553564), Fc(CD16/CD32)-PeCy7 (560829), and streptavidin-amCyan (563261) were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Fas-APC (152603) was supplied by Biolegend (San Diego, CA). TACI-Biotin (ABIN1169259) and BAFF-R-Biotin (ABIN1169050) were purchased from Antibodies-online.com (USA). BAFF-APC (130-111-029) was obtained from Miltenyi Biotec (Madrid, Spain). For transcription factors and APRIL intracellular staining, mononuclear cells were permeabilized following the manufacturer's instructions of the FoxP3 Staining Buffer Set (00-5523-00, ebioscience) and using the following set of MoAbs to T-bet-Pe/Cy7 (25-5825-82), ROR γ t-APC (53-9966-42), FoxP3-PacificBlue (48-5773-82), GATA3-FITC (53-9966-42), all from ebioscience (San Diego, CA), and APRIL-APC (130-105-388) from Miltenyi Biotec (Madrid, Spain).

Proliferation Assays

Splenocytes from 6-week-old female NOD, BDC2.5-NOD, 116C-NOD, and NOD-*PerIg* mice were obtained mechanically disrupting their spleens, and red cells were lysed in 0.87% ammonium chloride solution. Spleens from BDC2.5-NOD mice

were donated by Dr. Pau Serra from his mouse colony at the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain. T- and B-lymphocytes were purified by negative selection using MACS T- and B-lymphocyte isolation reagent (130-095-130 and 130-090-862 respectively, Myletmy Biotec, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions. The purity of T- and B-lymphocytes was always above 90%. For B proliferation assays, previous CFSE (C34554, life technologies) labeled B-lymphocytes were incubated in 96-well tissue culture plates (3×10^5 /well) at 37°C in 5% CO_2 in complete culture medium using the following stimuli: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS (L3012-5MG, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO), or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-CD40 (553787, BD Biosciences, clone 3/23) plus 10 U/mL rIL-4 (404-ML-010, R&D Systems, Minneapolis, MN), or anti-IgM, affinity pure F(ab')₂ (JAC-715-006-020, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). After 48 h of culture, the phenotype of B-lymphocytes was analyzed by flow cytometry and culture supernatants were stored at -80°C until use. A minimum of four animals per group was analyzed. For T-lymphocyte proliferation assays, previous CFSE labeled T-lymphocytes from spleens of NOD or BDC2.5-NOD mice were co-cultured (3×10^5 cell/well) with purified B-lymphocytes (3×10^5 cell/well) of NOD, NOD-*PerIg* or 116C-NOD to check B-lymphocyte capacity to promote T-lymphocyte proliferation. 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-CD3 MoAb (553058, BD), or 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of 2.5HIP peptide (LQTLALWSRMD) synthesized by the proteomics and protein chemistry unit of Pompeu Fabra University (Barcelona), was also added to cultures or anti-CD3 coated plates to boost T-lymphocyte activation. Seventy-two hours later, cells were analyzed by flow cytometry and culture supernatants stored at -80°C until use. All B- and T-lymphocyte proliferation assays were performed in duplicate.

Cytokine Profile Analysis

Culture supernatants from proliferation assays were collected and IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , IL-10, TNF- α , and IL-17 cytokine amounts analyzed by flow cytometry using CBA kit (560485, BD).

Statistics

PRISM Graphpad software was used for analysis. Statistics were performed using log-rank (Mantel-Cox) and Mann-Whitney *U*-tests. All mean values \pm SD are shown.

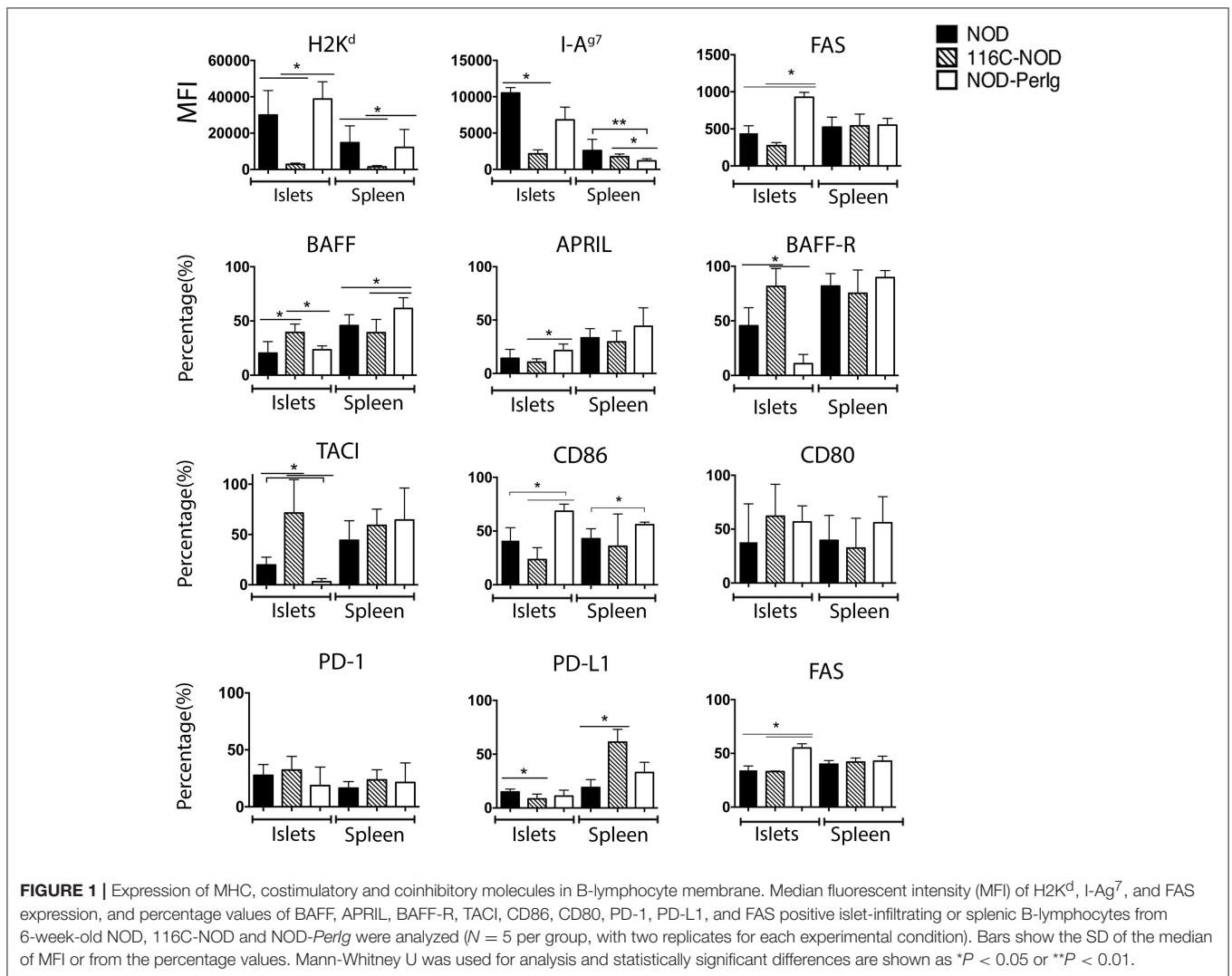
RESULTS

Marked Phenotype Differences Between B-Lymphocytes From 116C-NOD and NOD-*PerIg* Mice

Since B-lymphocytes play an important role in presenting β -cell autoantigens to autoreactive T-lymphocytes in autoimmune diabetes, the present study first analyzed the expression of MHC and CD80, CD86, BAFF, BAFF-R, APRIL, and TACI costimulatory and coinhibitory molecules in spleen and islet infiltrating B-lymphocytes (IIBLs) from 116C-NOD and NOD-*PerIg* mice. MHC class I and class II expression were deeply

down-regulated in both IIBLs and splenic B cells from 116C-NOD, whereas only MHC class II was down-regulated in splenic B cells from NOD-*PerIg* mice compared to wild type NOD mice (Figure 1). In regard to costimulatory molecules, the percentages of IIBLs positive for CD86 and APRIL were lower, but higher for BAFF, BAFF-R, and TACI in 116C-NOD when compared to wild type NOD and/or NOD-*PerIg* mice (Figure 1). In fact, the number of IIBLs positive for BAFF-R and TACI was almost absent in NOD-*PerIg*. Since TACI acts as an inhibitor for lymphocyte activation through BAFF/BAFF-R interaction, these results suggest that 116C-NOD IIBLs cannot induce activation signals for T cells. In contrast, the high percentage of IIBLs with up-regulation of costimulatory molecules suggests a high capacity of these cells from NOD-*PerIg* mice to be potential T-lymphocyte activators. The level and number of Fas+ IIBLs was higher in NOD-*PerIg* compared to NOD and 116C-NOD mice, thus suggesting that IIBLs from NOD-*PerIg* mice exhibit a high activation status. An increased percentage of BAFF+ B-lymphocytes is observed in the spleen of NOD-*PerIg* when compared to 116C-NOD and wild type NOD mice. A number of other less pronounced differences in the percentage or the expression of above mentioned molecules in splenic B-lymphocytes were also observed between mouse strains (Figure 1). The expression of PD-1 and PD-L1 coinhibitory molecules was then tested in IIBLs and splenic B-lymphocytes from 116C-NOD and NOD-*PerIg* mice. No differences were observed in the percentage of PD-1+ B-lymphocytes between mice. On the contrary, the percentage of PD-L1+ in IIBLs was lower in all three mouse models (Figure 1) suggesting low ability of B-lymphocytes to down regulate T-lymphocyte activity in islet pancreatic-infiltrate.

In addition to the phenotypic changes, the ability to respond to different stimuli determines the functional capacity of B-lymphocytes. As previously demonstrated, 116C B-lymphocytes have a decreased ability to proliferate but can still secrete some cytokines in response to LPS, anti-CD40 + IL-4, and anti-BCR (13). Proliferation and cytokine secretion analysis under the same stimuli were carried out with splenic B-lymphocytes from NOD-*PerIg*, 116C-NOD, and wild type NOD mice to compare their activation capacity. Significant differences were observed in the proliferation assays (Figure 2A). Interestingly, compared to 116C-NOD and wild type NOD mice, NOD-*PerIg* B-lymphocyte proliferation was higher at baseline and under anti-CD40 + IL-4 stimuli. Of note, under anti-BCR stimulation, NOD-*PerIg* B-lymphocytes did not proliferate (Figure 2A), and an increased number of dead cells was observed in the SSC-A/FSC-H flow cytometry analysis compared to baseline conditions (Supplementary Figure 3). Since NOD-*PerIg* B-lymphocytes seem to be already highly activated just after isolation (baseline condition), these results suggest that they might have undergone activation-induced cell death after BCR stimulation. Significant differences were also observed in the B-lymphocyte cytokine production of the different mouse strains. B-lymphocyte secretion of TNF- α to all different stimuli, IL-6 secretion after LPS and anti-CD40 + IL-4, and IL-10 secretion after LPS stimulation was significantly higher in NOD-*PerIg*

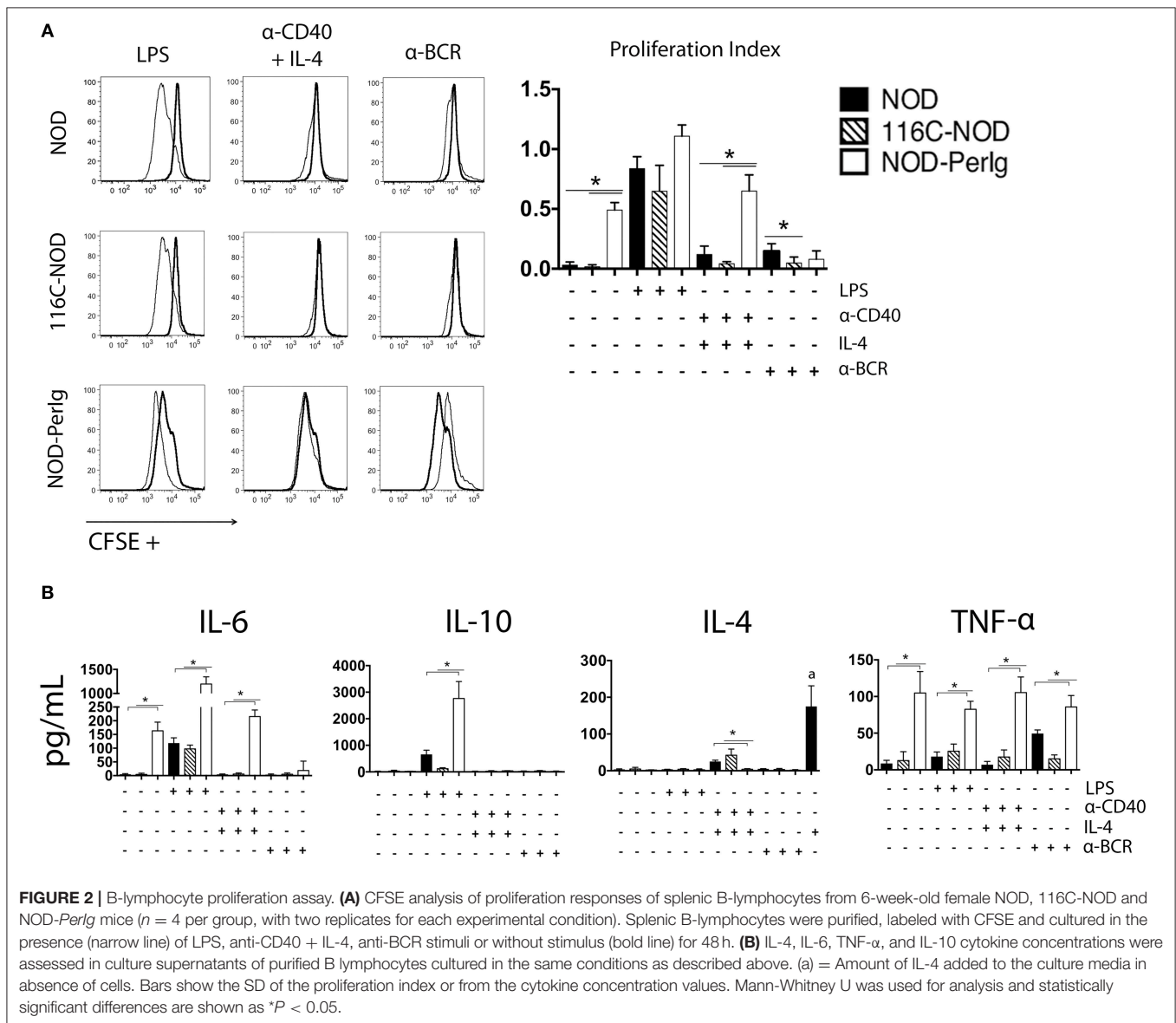


compared to 116C-NOD and wild type NOD mice (**Figure 2B**). Interestingly, B-lymphocytes from NOD-PerIg mice secreted high amounts of IL-6 and TNF- α cytokines, even without stimulation. Despite the external supply of IL-4, almost no IL-4 was detected in the B-lymphocyte culture wells under the stimulus of anti-CD40 + IL-4, thus suggesting a high uptake of this cytokine by NOD-PerIg B-lymphocytes during the culture period compared to 116C-NOD and wild type NOD mice (**Figure 2B**). Altogether, these results suggest that NOD-PerIg B-lymphocytes display an activated phenotype and, consequently, might be able to activate autoreactive T-lymphocytes and induce autoimmune diabetes development more efficiently than 116C-NOD B-lymphocytes.

Spleen and Islet Infiltrating T-Lymphocytes From 116C-NOD and NOD-PerIg Mice Are Phenotypically Different

Since the functional status of B-lymphocytes can decisively impact T-lymphocyte behavior, the phenotypic characteristics

of spleen and islet-infiltrating T-lymphocytes were analyzed in NOD, 116C-NOD, and NOD-PerIg mice. As previously reported (12), B-lymphocytes from 116C-NOD mice induced a shift toward a dominant T-lymphocyte Th17 differentiation, especially through double Th1/Th17 bias compared to NOD mice (**Figure 3A**). However, no significant differences were found regarding the T helper phenotype from CD4⁺ T-lymphocytes between NOD-PerIg and NOD mice either in the spleen or in the pancreatic islet infiltrates. Only a significant increase in triple T-bet⁺ROR γ t⁺FoxP3⁺ CD4⁺ T-lymphocytes was detected in the spleen of NOD-PerIg compared to NOD mice. The expression of PD-1 and PD-L1 by splenic and islet infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes from NOD, 116-NOD and NOD-PerIg mice was then analyzed (**Figure 3B**). A significant increase in the expression of PD-1 was observed in CD4⁺ IITLs from NOD-PerIg compared to 116C-NOD, and in CD8⁺ IITLs from NOD-PerIg and 116C-NOD compared to NOD mice. These data indicate that the CD8⁺ IITLs in both NOD-PerIg and 116C-NOD mice have a highly activated phenotype. However,



a high percentage of CD4+ IITLs express PD-1 only in NOD-PerIg, suggesting that full activation of the IITLs occurs just in these mice.

NOD-PerIg B-Lymphocytes Induce High CD4+ and CD8+ T-Cell Activation

A growing body of evidence indicates that B-lymphocytes can contribute to autoimmune diabetes development by acting as APCs activating β -cell autoreactive T-cells (1, 4, 10, 17–20). However, it has also been demonstrated that some B-lymphocytes can protect from disease development by inducing β -cell autoreactive CTLs apoptosis or/and inhibiting APC activity (11). Previous studies with 116C-NOD and NOD-PerIg mice support the idea that B-lymphocytes can perform both actions depending on their functional status (12, 13). The present study indicates that the profound phenotypic and functional

differences between 116C-NOD and NOD-PerIg B-lymphocytes could explain their dual role in respectively inhibiting or promoting autoimmune diabetes development. Thus, the ability of B-lymphocytes from 116C-NOD and NOD-PerIg to induce distinct NOD T-cell responses was then evaluated. The ability of 116C-NOD and NOD-PerIg B-lymphocytes to induce T-lymphocyte proliferation was analyzed first. The results showed that NOD-PerIg B-lymphocytes had a higher capacity than those from 116C-NOD and NOD mice to induce CD4+ T-lymphocyte proliferation (Figure 4A). Interestingly, the percentage of PD-1 positive CD4+ and CD8+ T-lymphocytes was significantly higher when co-cultured with NOD-PerIg B-lymphocytes compared to those co-cultured with B-lymphocytes from NOD and/or 116C-NOD mice (Figure 4B), thus confirming the T-lymphocyte activation status. Next, the expression of BAFF, BAFF-R, APRIL, and TACI costimulatory molecules,

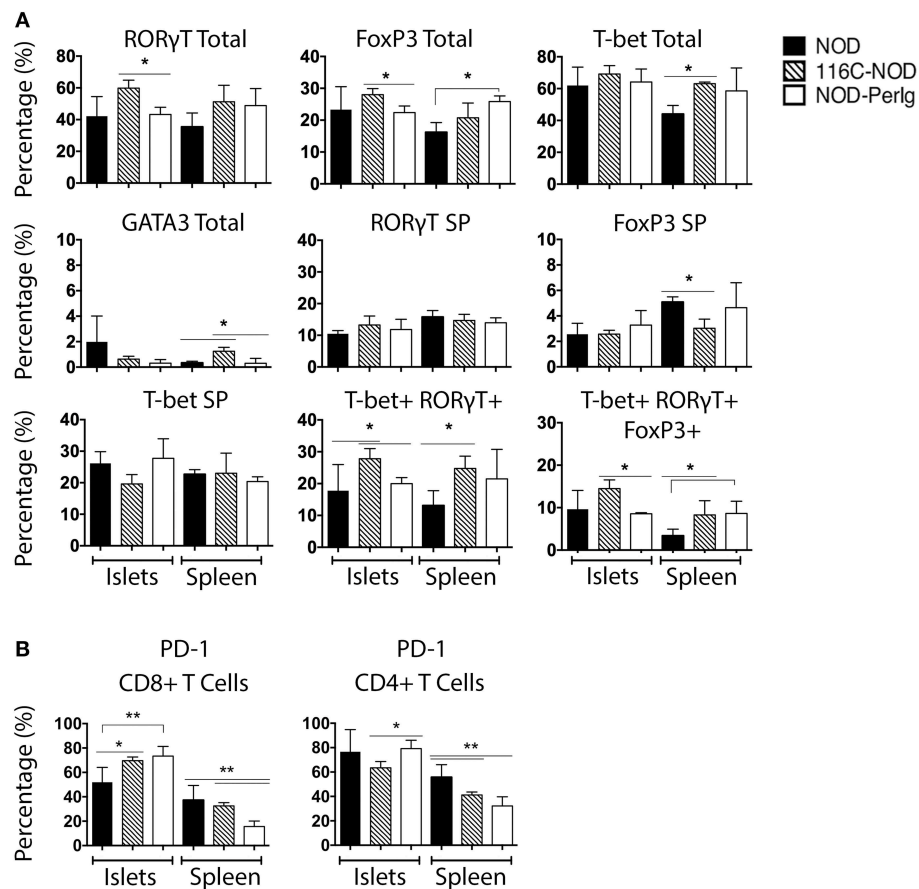


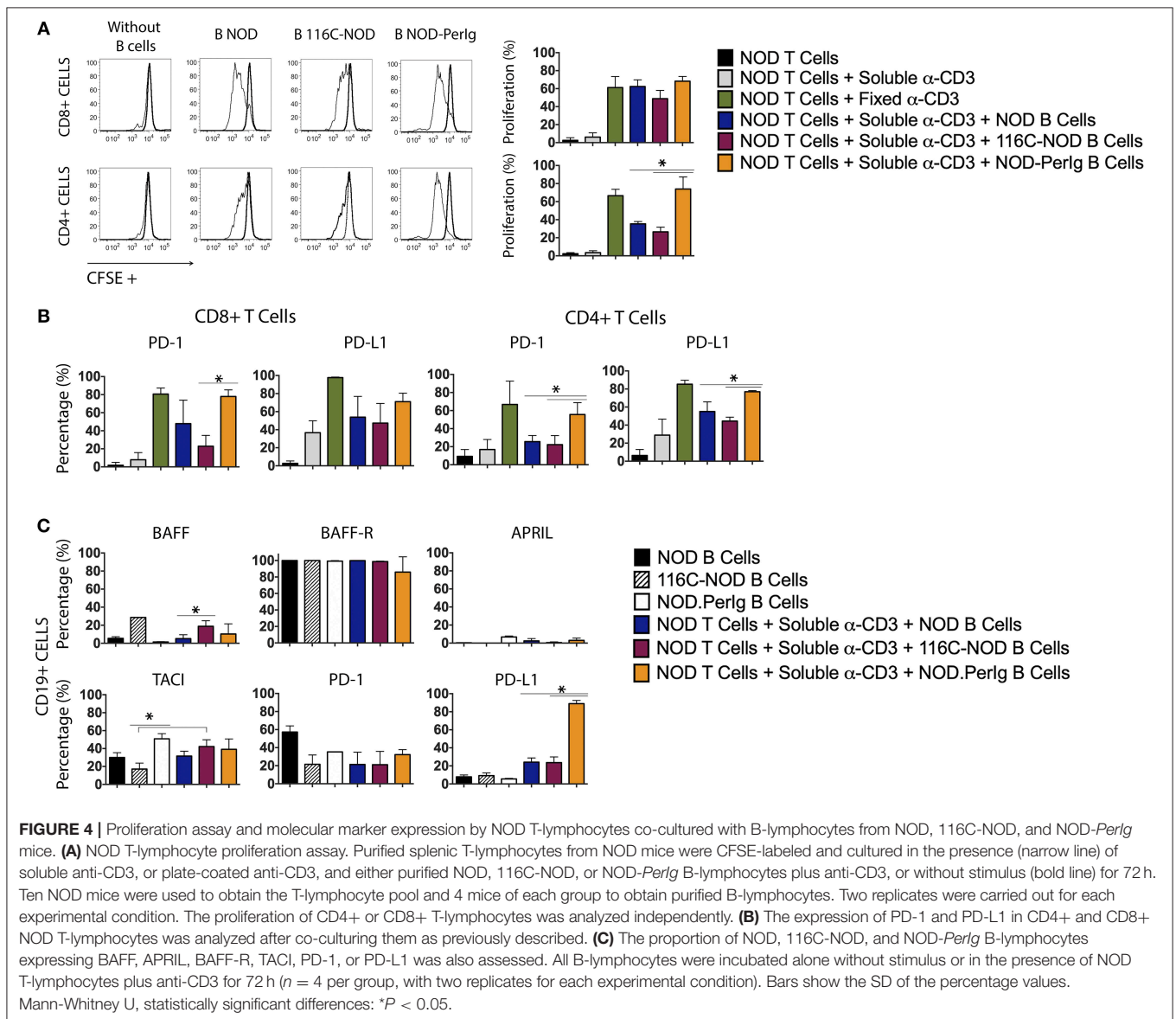
FIGURE 3 | Phenotype of unstimulated splenic and islet-infiltrating NOD, 116C-NOD, and NOD-*Perlg* T-lymphocytes. **(A)** T-bet, RORγt, GATA3, and FoxP3 expression was assessed by flow cytometry in splenic and islet-infiltrating T-lymphocytes from 6-week-old female NOD, 116C-NOD and NOD-*Perlg* mice ($n = 4$ per group, with two replicates for each experimental condition). “Total” and “SP” stand for the percentage of “whole positive” and “single positive” cells for the aforementioned marker, respectively. **(B)** Expression of PD-1 was analyzed by flow cytometry in the spleen and islet-infiltrating T-lymphocytes from 6-week-old female NOD, 116C-NOD and NOD-*Perlg* mice ($n = 4$ per group, with two replicates for each experimental condition). Bars show the SD of the percentage values. Mann-Whitney U, statistically significant differences: * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$.

and PD-1 and PD-L1 was also assessed in B-lymphocytes after co-culture with T-cells. The results indicated that a significant number of B-lymphocytes from NOD-*Perlg*, but not from NOD or 116-NOD mice, expressed PD-L1, thus being protected from the CTLs killing (Figure 4C). These results indicated that NOD-*Perlg* B-lymphocytes display a highly activated phenotype that promoted both CD4+ and CD8+ T-lymphocyte activation.

B-Lymphocytes From NOD-*Perlg* Mice Enforce NOD T Cells Toward a Quadruple T-Bet+ GATA3+ RORγT+ Foxp3+ Phenotype

As previously shown, B-lymphocytes from 116C-NOD mice induce a shift toward a dominant T-lymphocyte Th1/Th17 differentiation (12). In the present study, the capacity of B-lymphocytes from NOD-*Perlg* mice to modulate and conduct

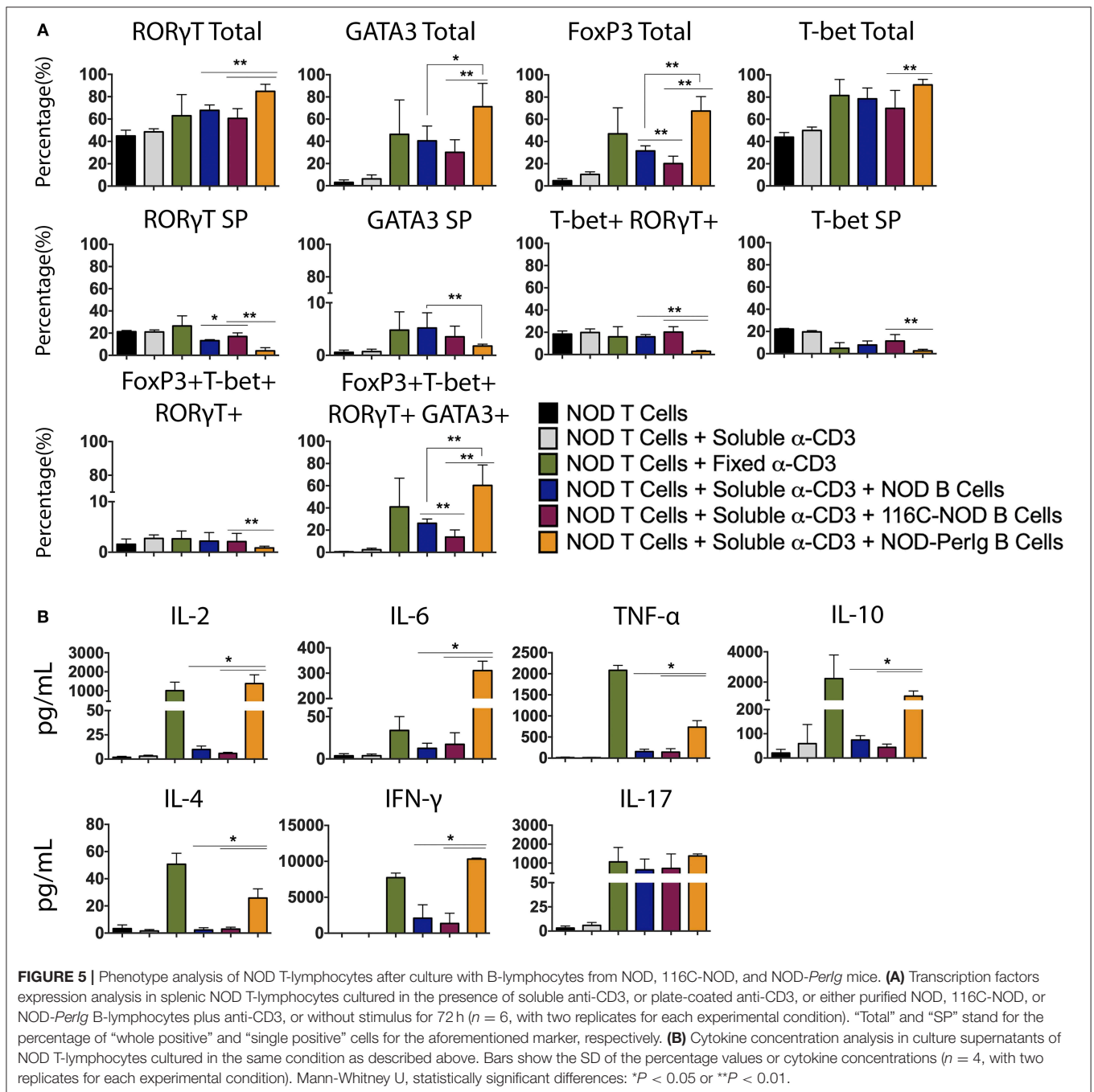
CD4T helper responses was evaluated. As in previous assays, transcription factor expression and cytokine production by T-lymphocytes from NOD mice after co-culture with B-lymphocytes from NOD-*Perlg*, 116C-NOD or wild type NOD mice was analyzed. Interestingly, the results indicated that B-lymphocytes from NOD-*Perlg* mice led most NOD CD4+ T-lymphocytes toward a quadruple T-Bet+ GATA3+ RORγT+ Foxp3+ phenotype (Figure 5A). Moreover, cytokine production analysis showed that B-lymphocytes from NOD-*Perlg* mice prompted NOD T-lymphocytes to secrete significant amounts of cytokines from different T helper subsets, although with predominance of proinflammatory and Th1 cytokines, due to large amounts of IFN-γ secretion (Figure 5B). These results indicate that B-lymphocytes from NOD-*Perlg* mice are highly active that mainly promote Th1 responses but not exclusively, confirming that B-lymphocytes can enforce CD4 T-lymphocytes toward different T helper functions depending on their phenotype and behavior.



B-Lymphocytes From NOD-Perlg Presenting the 2.5HIP Epitope Promote High BDC2.5-NOD T-Lymphocyte Activation

In the above experiments, the differences observed in T-lymphocyte activation could be due to the ability of anti-CD3 antibody to bind to B-lymphocytes of the different mouse strains. To shed light on this issue, Fc receptor (CD16/CD32) expression on NOD-Perlg, NOD, and 116C-NOD B-lymphocytes was analyzed. Higher Fc expression was observed in NOD-Perlg compared to NOD and 116C-NOD B-lymphocytes (Figure 6A). Thus, in order to confirm that the ability of NOD-Perlg B-lymphocytes to activate T-lymphocytes was due to their high capacity to express co-stimulation molecules and cytokine secretion, rather than or only by the increase in anti-CD3 binding capacity, BDC2.5-NOD T-lymphocyte

activation assays were performed. To this end, T-lymphocytes from BDC2.5-NOD were incubated with their 2.5HIP cognate epitope in the presence of B-lymphocytes from NOD, 116C-NOD, and NOD-Perlg mice. Although the proliferation of T-lymphocytes was not as high as expected, NOD-Perlg B-lymphocytes were able to induce more efficiently CD4 T-lymphocyte proliferation than their counterparts (Figure 6B). Although no differences in the transcription factor expression were detected (Figure 6C), BDC2.5-NOD T-lymphocytes co-cultured with NOD-Perlg produced larger amounts of cytokines than with NOD or 116C-NOD B-lymphocytes (Figure 6D). In fact, BDC2.5-NOD T-lymphocytes produced larger amounts of different cytokines distinctive of different T-lymphocyte subsets. Surprisingly, BDC2.5-NOD T-lymphocytes incubated with 116C-NOD proliferate as efficiently as when they were in the presence of B-lymphocytes from NOD. These results

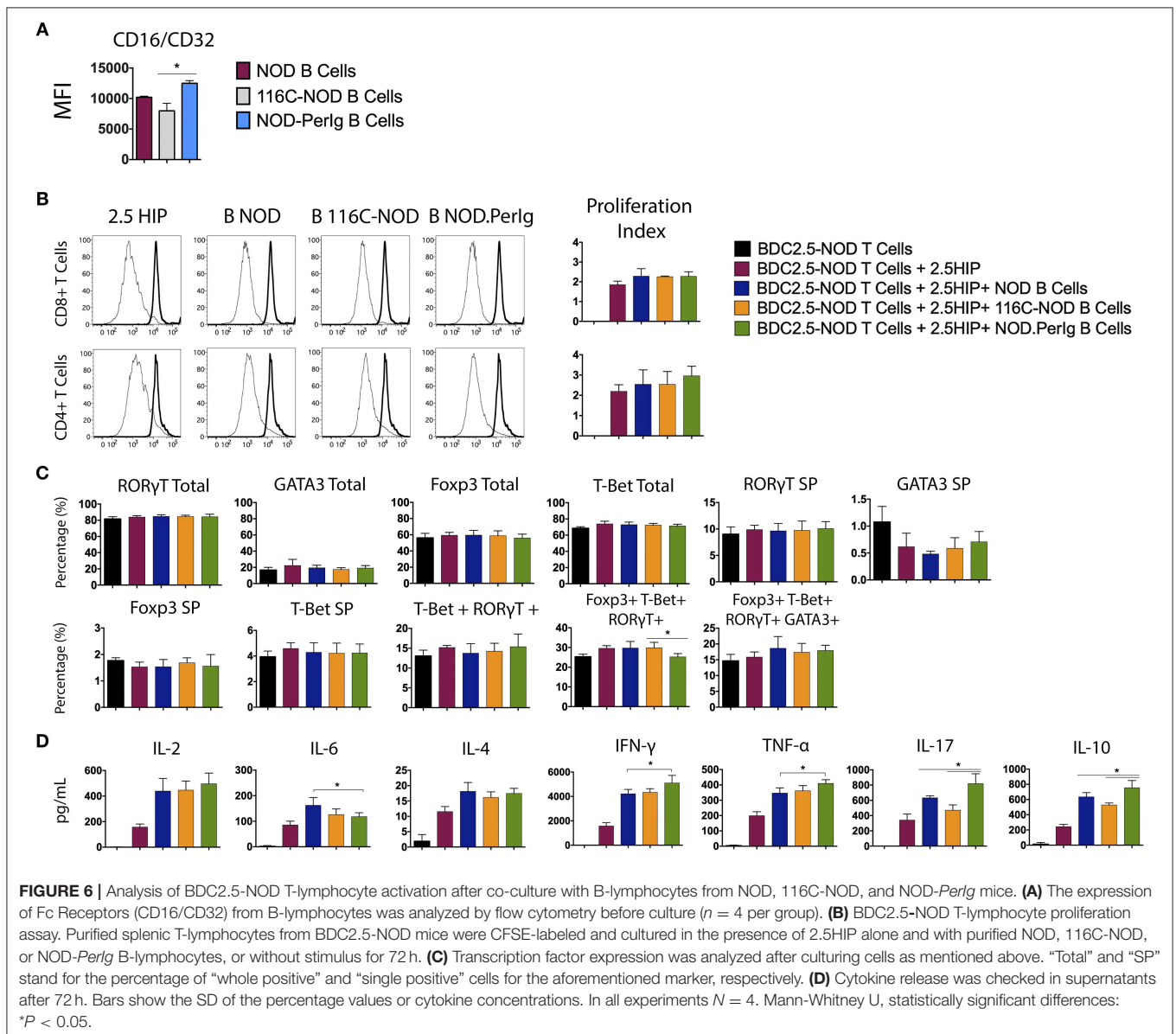


suggest the ability of 116C-NOD B-lymphocytes to overcome their “anergic” state in order to stimulate T-lymphocytes in the presence of an autoantigen. Nevertheless, their ability to induce cytokine production was not as good as the one of NOD or NOD-*PerIg* B-lymphocytes.

DISCUSSION

It is currently well accepted that B-lymphocytes contribute to the development of autoimmune diabetes. The lack of

B-lymphocytes in NOD mice prevents disease development (1–8), whereas depending on their antigenic specificity the transgenic expression of BCRs either induces, delays, or prevents autoimmune diabetes (10, 12, 13, 21–24). The diabetogenic capacity of B-lymphocytes in two BCR transgenic mice, the NOD-*PerIg* and the 116C-NOD strains (12, 13) was analyzed in previous studies. In 116C-NOD mice, B-lymphocytes display an anergic-like phenotype delaying autoimmune diabetes onset and decreasing disease incidence, whereas in NOD-*PerIg* mice, B-lymphocytes acquire an activated proliferative phenotype that



promotes disease development. Moreover, a T helper response imbalance toward a Th17 phenotype was observed in 116C-NOD compared to NOD mice, thus suggesting a strong linkage between B-lymphocyte phenotype and T-lymphocyte response.

By comparing the phenotype of the three mouse strains, the NOD, the 116C-NOD, and the NOD-*Perlg*, the present study sought to determine the most relevant B-lymphocyte traits during autoimmune diabetes. To this end, the linkage between phenotypic characteristics of B-lymphocytes and the ability of these cells to induce phenotypic and functional changes in T-lymphocytes was further analyzed. To this end, the expression of accessory molecules and cytokine secretion in B-lymphocytes from NOD-*Perlg*, 116C-NOD, and NOD mice was evaluated. Then, through a nonspecific anti-CD3 stimulus that mimics a signal through the TCR, the ability of these B-lymphocytes to induce T-lymphocyte activation was

also analyzed. With this approach, the effect was assessed independently from their antigenic specificity of expressed accessory molecules and secreted cytokines by the B-lymphocytes in the activation of the T-lymphocytes. Finally, B lymphocyte capacity to act as APCs in autoimmune diabetes environment was tested by analyzing the ability of these cells to present a known diabetes-related autoantigen, known as 2.5HIP, a Hybrid Insulin Peptide. In contrast to those from the NOD and 116C-NOD strains, B-lymphocytes from NOD-*Perlg* mice display an activated phenotype, secrete high amounts of proinflammatory cytokines (even without any B-lymphocyte stimulation), and induce significant T-lymphocyte activation. In addition, B-lymphocytes from 116C-NOD express significantly lower levels of MHC molecules compared to those from NOD and NOD-*Perlg* mice, thus indicating their inability to perform a good antigen presentation. Although a previous study

showed that CD86 expression levels in B-lymphocytes from 116C-NOD mice were high (12) suggesting perhaps a greater capacity for activation of T-lymphocytes, the percentage of B-lymphocytes expressing CD86 is lower in 116C-NOD than in NOD and NOD-*PerIg* mice. Moreover, since BAFF-R and TACI is higher in 116C-NOD than in NOD and NOD-*PerIg* mice and taking into account that TACI acts as an inhibitor for lymphocyte activation through BAFF/BAFF-R interaction, these results suggest that 116C-NOD IIBLs cannot induce a strong T-lymphocyte activation. In fact, current and previous data (12) suggest that 116C-NOD B-lymphocytes would show a greater tendency to fostering a response toward Th17 phenotype. In contrast to the 116C-NOD B-lymphocytes, the expression levels of MHC molecules in B-lymphocytes from NOD-*PerIg* mice are similar to those from NOD mice. In addition, the percentage of B-lymphocytes expressing high levels of the CD86 molecule and low levels of TACI and BAFF-R is higher in NOD-*PerIg* mice compared to NOD and 116C-NOD mice, indicating the strong ability of B lymphocytes to activate T lymphocytes. Consistent with these results and those obtained in the analysis of the incidence of autoimmune diabetes, this study also shows that the NOD-*PerIg* B-lymphocytes have the capacity to proliferate and secrete proinflammatory cytokines, even in the absence of any stimulus, and induce a strong T-lymphocyte proliferation. Moreover, the results also indicate that NOD-*PerIg* B-lymphocytes induce CD4+ T-lymphocytes to differentiate toward a quadruple Bet+ GATA3+ ROR γ T+ Foxp3+ phenotype and to secrete cytokines characteristic from most different T helper subsets, although with predominance of proinflammatory and Th1 cytokines, thus contributing to autoimmune diabetes development (25). These findings were confirmed when we analyzed the ability of the different B-lymphocytes to induce specific responses to the known diabetes-related peptide 2.5HIP. Even without a polyclonal stimulus, NOD-*PerIg* B-lymphocytes were able to activate specific responses from BDC2.5-NOD T-lymphocytes, inducing a higher production of different cytokines when compared to the other two strains. On the contrary, no changes were found between strains in the phenotype of BDC2.5-NOD CD4+ T-lymphocytes after stimulation with the 2.5HIP cognate epitope. This could be due to their transgenic nature, being their prefixed phenotype strong enough to support any input, compared to NOD CD4+ T-lymphocytes. As observed in previous works carried out with the transgenic model 125tg-NOD (20), our results indicate that 116C-NOD B-lymphocytes can induce T-lymphocyte activation and cytokine production in very specific situations despite their “anergic phenotype.”

Thus, this study also clearly shows that depending on their phenotype and behavior (secreted cytokine and accessory molecule expression), B-lymphocytes from NOD, 116C-NOD, and NOD-*PerIg* mice can promote CD4+ T lymphocytes toward different T helper functions. The present findings also illustrate that to face any insult, the immune system can bring a combined T helper response exerted by several CD4+ T-lymphocyte populations if required. Moreover, since the immune system has an enormous plasticity and redundancy, other CD4+ T-lymphocytes populations of T helper that are phenotypically

double, triple or even quadruple Th positive may also be found (26). For instance, CD4+ T-lymphocytes that are at the same time Th1 and Th17, or other multiple possible combinations, even some that simultaneously display multiple Th type markers. A cell population can also pass from one phenotype to another in the presence of certain cytokines. For example, a subpopulation of Th9 can be differentiated from Th2 in the presence of TGF- β (27).

In summary, this study highlights the existing interdependence between B- and T-lymphocytes, which gives to the former populations the chance to set up T-lymphocyte phenotypes through the secretion of cytokines and the expression of costimulatory and co-inhibitory molecules. In terms of autoimmune diabetes, this study also confirms that the most harmful response for disease development comes from a concomitant Th1/proinflammatory response, and that B-lymphocytes play the key role in the establishment of this response.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of Catalan and Spanish Government guidelines for Animal Experimentation (Directiva 2010/63/UE; Real Decreto 53/2013; Llei 5/1995/GC; Orden 214/1997/GC). Ethical Committee of Animal Experimentation of the University of Lleida. Experimental procedure # CEEA, 02-04/16.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LE-M researched data and wrote the manuscript. BA, ER-M, MC-P, JCarrascal, JCarrillo, HC, and AP researched data. CM, MV-P, and TS contributed to discussion, and reviewed the manuscript. DS co-conceived the study, contributed to discussion, and reviewed manuscript. JV conceived the study, evaluated data, wrote, reviewed and edited to the manuscript. JV is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. All authors revised the work and gave final approval of the version to be published.

ACKNOWLEDGMENTS

The research described in this publication was partially supported by the Plan Nacional de I+D+i of the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2016-77227-R), CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM) that is an initiative from Instituto de Salud Carlos III (Spain) and the Juvenile Diabetes Research Foundation 5-2005-1133 innovative research grant. LE-M, ER-M, and MC-P, were supported by pre-doctoral fellowships from the University of Lleida and the IRBLleida. JCarrascal was supported by a FPI pre-doctoral fellowship (BES-2007-15221) from the Spanish Ministry of Science and Innovation. JV, MC-P, and TS are associate professors from the Serra-Hunter Program from the Catalan Government. DS is supported by NIH grants DK46266 and DK95735 as well

as by grants from the Juvenile Diabetes Research Foundation, the American Diabetes Association, and Helmsley Charitable Trust (#2014PG-T1D048). We thank Dr. Jeremy Racine and Mr. Qiming Wang for reviewing the manuscript. Special thanks to Ms. D. Cullell-Young for English grammar assistance.

REFERENCES

- Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, Hanson MS, Reifsnnyder PC, Richard SD, et al. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice. *J Exp Med.* (1996) 184:2049–53. doi: 10.1084/jem.184.5.2049
- Akashi T, Nagafuchi S, Anzai K, Kondo S, Kitamura D, Wakana S, et al. Direct evidence for the contribution of B cells to the progression of insulinitis and the development of diabetes in non-obese diabetic mice. *Int Immunol.* (1997) 9:1159–64. doi: 10.1093/intimm/9.8.1159
- Wong FS, Visintin I, Wen L, Granata J, Flavell R, Janeway CA. The role of lymphocyte subsets in accelerated diabetes in nonobese diabetic-rat insulin promoter-B7-1 (NOD-RIP-B7-1) mice. *J Exp Med.* (1998) 187:1985–93. doi: 10.1084/jem.187.12.1985
- Noorchashm H, Noorchashm N, Kern J, Rostami SY, Barker CF, Najj A. B-cells are required for the initiation of insulinitis and sialitis in nonobese diabetic mice. *Diabetes.* (1997) 46:941–6. doi: 10.2337/diab.46.6.941
- Bouaziz JD, Yanaba K, Venturi GM, Wang Y, Tisch RM, Poe JC, et al. Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell activation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2007) 104:20878–83. doi: 10.1073/pnas.0709205105
- Fiorina P, Vergani A, Dada S, Jurewicz M, Wong M, Law K, et al. Targeting CD22 reprograms B-cells and reverses autoimmune diabetes. *Diabetes.* (2008) 57:3013–24. doi: 10.2337/db08-0420
- Hu CY, Rodriguez-Pinto D, Du W, Ahuja A, Henegariu O, Wong FS, et al. Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest.* (2007) 117:3857–67. doi: 10.1172/JCI32405
- Xiu Y, Wong CP, Bouaziz JD, Hamaguchi Y, Wang Y, Pop SM, et al. B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. *J Immunol.* (2008) 180:2863–75. doi: 10.4049/jimmunol.180.5.2863
- Hulbert C, Riseili B, Rojas M, Thomas JW. B cell specificity contributes to the outcome of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* (2001) 167:5535–8. doi: 10.4049/jimmunol.167.10.5535
- Silveira PA, Johnson E, Chapman HD, Bui T, Tisch RM, Serreze DV. The preferential ability of B lymphocytes to act as diabetogenic APC in NOD mice depends on expression of self-antigen-specific immunoglobulin receptors. *Eur J Immunol.* (2002) 32:3657–66. doi: 10.1002/1521-4141(200212)32:12<3657::AID-IMMU3657>3.0.CO;2-E
- Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu Y, Olcott A, Kaufman DL. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* (2001) 167:1081–9. doi: 10.4049/jimmunol.167.2.1081
- Carrascal J, Carrillo J, Arpa B, Egia-Mendikute L, Rosell-Mases E, Pujol-Autonell I, et al. B-cell anergy induces a Th17 shift in a novel B lymphocyte transgenic NOD mouse model, the 116C-NOD mouse. *Eur J Immunol.* (2016) 46:593–608. doi: 10.1002/eji.201445376
- Leeth CM, Racine J, Chapman HD, Arpa B, Carrillo J, Carrascal J, et al. B-lymphocytes expressing an immunoglobulin specificity recognizing the pancreatic β -cell autoantigen peripherin are potent contributors to type 1 diabetes development in NOD mice. *Diabetes.* (2016) 65:1977–87. doi: 10.2337/db15-1606
- Carrillo J, Puertas MC, Alba A, Ampudia RM, Pastor X, Planas R, et al. Islet-infiltrating B-cells in nonobese diabetic mice predominantly target nervous system elements. *Diabetes.* (2005) 54:69–77. doi: 10.2337/diabetes.54.1.69
- Puertas MC, Carrillo J, Pastor X, Ampudia RM, Planas R, Alba A, et al. Peripherin is a relevant neuroendocrine autoantigen recognized by islet-infiltrating B lymphocytes. *J Immunol.* (2007) 178:6533–9. doi: 10.4049/jimmunol.178.10.6533
- Puertas MC, Carrillo J, Pastor X, Ampudia RM, Alba A, Planas R, et al. Phenotype and functional characteristics of islet-infiltrating B-cells suggest the existence of immune regulatory mechanisms in islet milieu. *Diabetes.* (2007) 56:940–9. doi: 10.2337/db06-0428
- Falcone M, Lee J, Patstone G, Yeung B, Sarvetnick N. B lymphocytes are crucial antigen-presenting cells in the pathogenic autoimmune response to GAD65 antigen in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* (1998) 161:1163–8.
- Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* (1998) 161:3912–8.
- Noorchashm H, Lieu YK, Noorchashm N, Rostami SY, Greeley SA, Schlachterman A, et al. I-Ag7-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice. *J Immunol.* (1999) 163:743–50.
- Kendall PL, Case JB, Sullivan AM, Holderness JS, Wells KS, Liu E, et al. Tolerant anti-insulin B cells are effective APCs. *J Immunol.* (2013) 190:2519–26. doi: 10.4049/jimmunol.1202104
- Rojas M, Hulbert C, Thomas JW. Anergy and not clonal ignorance determines the fate of B cells that recognize a physiological autoantigen. *J Immunol.* (2001) 166:3194–200. doi: 10.4049/jimmunol.166.5.3194
- Acevedo-Suárez CA, Hulbert C, Woodward EJ, Thomas JW. Uncoupling of anergy from developmental arrest in anti-insulin B cells supports the development of autoimmune diabetes. *J Immunol.* (2005) 174:827–33. doi: 10.4049/jimmunol.174.2.827
- Packard TA, Smith MJ, Conrad FJ, Johnson SA, Getahun A, Lindsay RS, et al. B cell receptor affinity for insulin dictates autoantigen acquisition and B cell functionality in autoimmune diabetes. *J Clin Med.* (2016) 5:98. doi: 10.3390/jcm5110098
- Felton JL, Maseda D, Bonami RH, Hulbert C, Thomas JW. Anti-insulin B cells are poised for antigen presentation in type 1 diabetes. *J Immunol.* (2018) 201:861–73. doi: 10.4049/jimmunol.1701717
- Walker LS, von Herrath M. CD4 T cell differentiation in type 1 Diabetes. *Clin Exp Immunol.* (2015) 183:16–29. doi: 10.1111/cei.12672
- DuPage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol.* (2016) 16:149–63. doi: 10.1038/nri.2015.18
- Veldhoen M, Uytendhove C, van Snick J, Helmsby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor- β 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol.* (2008) 9:1341–6. doi: 10.1038/ni.1659

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Egia-Mendikute, Arpa, Rosell-Mases, Corral-Pujol, Carrascal, Carrillo, Mora, Chapman, Panosa, Vives-Pi, Stratmann, Serreze and Verdaguer. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

