



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**ROL DEL INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASAS
LEUCOCITARIAS (SLPI) EN LA PROGRESIÓN
TUMORAL**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Química Biológica

Nicolás Oscar Amiano

Director de tesis: Dr. H. Eduardo Chuluyan

Consejero de Estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "Jose de San
Martín" y 3ra. Cátedra de Farmacología. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos
Aires

Buenos Aires, 2008

a Marina

AGRADECIMIENTOS

- A Marina. Por ser mi esposa, mi novia, mi mejor amiga, mi confidente, mi corazón, mi compañera en *todo* desde hace quince años (casi la mitad de mi vida!). Por soportarme tal y como soy y darme siempre una palabra de aliento. Gracias por mirarme y saber lo que estoy pensando, gracias por estar siempre a mi lado, gracias por elegirme para compartir toda tu vida.
- A mis padres y hermano que siempre me acompañaron en todas mis decisiones. A mi vieja por enseñarme a amar a todas las personas por igual y por ser la mejor mamá del mundo. A mi viejo que de chiquito puso en mí el deseo de aprender e investigar *todo*. A Sebi, por ser tan distinto a mí y sin embargo tener tantas cosas en común.
- A toda la familia de Marina, por aceptarme tal cual soy y hacerme sentir un hijo más.
- A todos mis amigos de siempre. Sin ningún orden especial: Hernán, Martín, Juan Pablo, Lucas, Eduardo (mi cuñado!), Toto, Pini, Torvi, Mama, Yagui, Adrián, Julito, el Colo, Saina y Marquitos. Por tantas cosas compartidas juntos, campamentos y vacaciones, partidos de fútbol, de tenis, recitales, asados y un largísimo etcétera.
- A toda la comunidad de la Parroquia Luján Porteño. Por ser mi otra familia y mi segundo hogar.
- Al Lic. José Luis Lago, porque sino fuera por él, nunca hubiese descubierto mi pasión por la ciencia.
- A mis compañeros de la facu, con los que pasamos horas y horas estudiando desde la ecuación de Schrödinger hasta las proteínas de la leche, desde el funcionamiento de un espectrofotómetro hasta el sistema inmune, desde las reacciones de síntesis orgánica hasta la toxicidad de los piretroides. A Edu Bonorino, Martín Mirenda, Martín Fernández, Andi Zelcer, Ale Crespo, Mariano Lerda, , Carlitos y Mariana, Marcos y Flor, Maria Marta, Silvina, Caro, Pablito, Sole, Seba, Juan y muchos

más. Como los químicos no hacemos tesis de licenciatura aprovecho para agradecerles ahora por hacerme más fácil los días de estudio.

- A todos mis compañeros del labo. A las chicas: Nancy, July, Maca, Sonia, Mercedes y Xime; y a los chicos: a Paulo (por las idas a la cancha a ver al Globo) y a Diego (por los partidos de fútbol con Blues en el torneo interno de la FCEyN y por los de ping-pong). Gracias por su constante buena onda y alegría. Gracias por hacer que en el trabajo lo pase súper bien!!!
- Al Dr. H. Eduardo Chuluyan, por permitirme desarrollarme profesionalmente bajo su dirección. Gracias por los consejos y sugerencias a lo largo de estos años y durante la elaboración de esta tesis.
- A toda la gente del Área de Química y Microbiología de Alimentos del Depto. de Química Orgánica de la FCEyN donde me desempeño como docente.
- A la Dra. Adriana Veleiro y al Dr. Gerardo Burton por darme la posibilidad de iniciarme en la investigación científica.
- Al Dr. Rodolfo Rothlin por abrirnos las puertas de la 3ra Cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica que me otorgaron las becas con las que pude realizar este doctorado.
- A la Universidad de Buenos Aires, por ser libre y gratuita, y, en particular, por el nivel de excelencia de los docentes e investigadores que me formaron.
- Al gran J.R.R. Tolkien. porque sus libros me acompañaron siempre en todos estos años.

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo

ADNc: ADN copia

ANOVA: Análisis de varianza

ARNm: ARN mensajero

c.p.m: Cuentas por minuto

CD: Cluster de diferenciación

CDs: Células dendríticas

DO: Densidad óptica

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima

ESM: Error estándar de la media

FACS: Citometría de flujo

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GM-CSF: Factor estimulante de colonias para granulocitos y macrófagos

HLA: Antígenos leucocitarios humanos

IFN- γ : Interferón γ

IL: Interleuquina

IP: Ioduro de propidio

LT: Linfocito T

mAb: Anticuerpo monoclonal

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NK: Célula natural killer

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

PE: Ficoeritrina

PMNs: Leucocitos polimorfonucleares

SBF: Suero bovino fetal

SD: Desviación estándar

SLPI: Inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias

SLPIrh: Inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias recombinante humano

TNF- α : Factor de necrosis tumoral

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8 - 60
1. CÁNCER	8 - 15
1.1 Conceptos Básicos	8 - 9
1.2 Crecimiento tumoral	
10 - 15	1.2.1 Etapas en el desarrollo del cáncer
10 - 11	1.2.2 Características biológicas de las células tumorales
11 - 15	
2. RESPUESTA INMUNE Y CÁNCER	16 - 39
2.1 Respuesta inmune	16 - 22
2.1.1 Inmunidad innata	16 - 17
2.1.2 Inmunidad adaptativa	17 - 19
2.1.3 Desarrollo de la respuesta inmune adaptativa	19 - 22
2.2 Inmunobiología tumoral	22 - 34
2.2.1 Inmunovigilancia	22 - 23
2.2.2 Antígenos tumorales	24 - 25
2.2.3 Efectores de la respuesta inmune antitumoral	25 - 26
2.2.4 Teoría de la inmunoección del cáncer	27 - 29
2.2.5 Mecanismos de escape tumoral	30 - 34
2.3 Leucocitos polimorfonucleares (PMN) y cáncer	34 - 39
2.3.1 Leucocitos polimorfonucleares (PMN): Neutrófilos	34 - 36
2.3.2 Los neutrófilos en reacciones antitumorales	37 - 39
3. APOPTOSIS Y CÁNCER	40 - 47
3.1 Apoptosis: Generalidades	40 - 43

3.1.1 Mecanismo secretor	41 - 42
3.1.2 Mecanismo no secretor	42 - 43
3.2 Evasión de la apoptosis en procesos tumorales	43 - 47
3.2.1 Mecanismos de evasión basados en la residencia a la apoptosis	43 - 46
3.2.2 Mecanismos de evasión basados en la modulación de linfocitos T	46 - 47
4. INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASAS LEUCOCITARIAS	48 - 60
4.1 Generalidades	48 - 50
4.2 Funciones del SLPI	50 - 55
4.2.1 Propiedades inhibitorias	50 - 51
4.2.2 Actividad anti-HIV-1	52
4.2.3 Actividad anti-bacteriana y anti-fúngica	52 - 53
4.2.4 Actividad anti-inflamatoria	53 - 54
4.2.5 Reparación tisular y proliferación celular	54 - 55
4.3 SLPI y cáncer	55 - 60

OBJETIVOS 61

MATERIALES Y MÉTODOS	62 - 80
Líneas celulares y condiciones de cultivo	62 - 63
Obtención de células mononucleares de sangre periférica	63
Obtención de monocitos	63 - 64
Generación de células dendríticas	64 - 65
Obtención de esplenocitos murinos	65
Ensayos de proliferación linfocitaria	65 - 66
Estimulación con IL-2 y con Con A	66
Estimulación con anti-cuerpo anti-CD3	66
Obtención de células NK humanas	67

Ensayo de citotoxicidad	67 - 68
Expresión y purificación de SLPIrh	68 - 69
Ensayo de inhibición de tripsina	69 - 70
Clonado de SLPIh en un vector de expresión eucariota	70 - 71
Análisis de moléculas de superficie por citometría de flujo	71 - 73
Marcaciones de monocitos y CDs	71 - 72
Marcaciones de líneas celulares	72
Anticuerpos monoclonales utilizados para citometría	72 - 73
ELISA sobre monocapa de células HeLa viables	73 - 74
ELISA para estudiar producción de SLPIh	74
Transfecciones de células HeLa y F3II	74 - 76
Transfección transiente de células HeLa	74 - 75
Transfección estable de células HeLa y F3II con el gen de SLPIh y obtención de clones	75 - 76
Ensayos de apoptosis	76 - 78
Medición de apoptosis basal en clones de F3II	76 - 77
Medición de apoptosis de células F3II tratadas con SLPI	77
Medición de apoptosis de células del clon 2C1 en presencia de plasma de ratones inoculados con el clon 2C1	77 - 78
Ensayos de proliferación celular de clones de células F3II	78
Preparación de microesferas conteniendo SLPIrh	78 - 79
Experimentos <i>in vivo</i>	79 - 80
Depleción de poblaciones celulares	80
Análisis estadístico	80
RESULTADOS	81 - 109
1. EFECTO DEL SLPI SOBRE CÉLULAS EPITELIALES	81 - 88
1.1 Tratamiento con SLPIrh exógeno	81 - 82
1.2 Efecto de la modulación de la producción endógena de SLPI	82 - 87
1.3 Ensayo de citotoxicidad	87 - 88
2. EFECTO DEL SLPI SOBRE MONOCITOS Y CDs	88 - 90

2.1 Monocitos	88 - 89
2.2 Células dendríticas	89 - 90
3. EFECTO DEL SLPI EN LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA	90 - 92
4. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN <i>IN VIVO</i> DE CÉLULAS F3II SOBREPRODUCTORAS DE SLPI	
92 - 103	4.1 Caracterización de las células F3II sobreproductoras de SLPIh
92 - 94	
4.2 Efecto de la administración de células tumorales productoras de SLPIh en ratones inmunocompetentes	95 - 96
4.3 Estudio de la participación de la respuesta inmune sobre el efecto antitumoral del SLPI	97 - 101
4.4 Análisis del plasma de ratones inoculados con células sobre- productoras de SLPI	101 - 103
5. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL SLPI EXÓGENO	103 - 106
6. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DEL EFECTO ANTI- TUMORAL DEL SLPI EXÓGENO	106 - 108
7. EFECTO ANTITUMORAL DEL SLPI MICROENCAPSULADO	108 - 109
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>110 - 120</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>121 - 122</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>123 - 134</u>

ROL DEL INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASAS LEUCOCITARIAS (SLPI) EN LA PROGRESIÓN TUMORAL

El SLPI es un inhibidor de serino proteasas de 11,7 kDa presente en mucosas y con actividad anti-inflamatoria. El objetivo de este trabajo fue esclarecer la función del SLPI en cáncer. Realizando estudios *in vitro* se determinó que SLPI disminuía la expresión de las moléculas CD54, CD29 y MHC clase I; sin embargo, las células HeLa tratadas con SLPI no fueron lisadas por células NK, sugiriendo que esta molécula podría ser un factor involucrado en los mecanismos de escape tumoral. Posteriormente se generaron clones de células derivadas de adenocarcinoma mamario murino hiperproductores de SLPIh y se observó que la administración s.c. de los mismos a ratones inmunocompetentes no generaba tumor. Sin embargo, los clones crecieron en ratones atímicos. La depleción de neutrófilos en ratones inmunocompetentes o en ratones atímicos permitió el crecimiento de los clones o aceleró la tasa de crecimiento de los mismos, respectivamente. La administración exógena de SLPI disminuyó el crecimiento de tumores de adenocarcinoma mamario y colon. El efecto antitumoral de SLPI fue indirecto, ya que el plasma derivado de los ratones inyectados con los clones hiperproductores de SLPI, pero no el plasma control ni el SLPI, indujeron la apoptosis de los clones. Estos resultados sugieren que SLPI tiene actividad antitumoral en determinado tipo de tumores.

Palabras claves: SLPI, Cáncer, Neutrófilos, Moléculas de superficie, Apoptosis

ROLE OF SECRETORY LEUKOCYTE PROTEASE INHIBITOR (SLPI) IN TUMOR PROGRESSION

The role of SLPI in cancer it is not completely elucidated. The aim of this work was to evaluate the SLPI pro or antitumoral activity. Intratumoral administration of SLPI reduced mammary and colon but not a lung adenocarcinoma tumor growth. This effect was independent of SLPI anti-protease activity. Furthermore, mammary tumor cells overexpressing hSLPI were not able to growth. In contrast, they were able to growth in Nude and mainly in neutrophils depleted Nude mice. Plasma derived from mice that were inoculated with SLPI overexpressing tumor cells induced the apoptosis of tumor cells. Overall this result indicates for the first time that exogenous administration of SLPI has an anti-tumoral effect which could be mediated by adaptive and innate immune responses through apoptosis. More importantly, our data suggest that SLPI presents an anti-tumoral effect allowing us to consider that this molecule could be used as a new pharmacological tool for the treatment of certain kind of tumors.

Key Words: SLPI, Cancer, Neutrophils, Cell Surface Molecules, Apoptosis

1. CÁNCER

1.1 CONCEPTOS BÁSICOS

El cáncer ha sido conocido por el hombre desde la antigüedad; los antiguos egipcios, por ejemplo, ya sabían de su existencia. Sin embargo, como la mayoría de los tumores se desarrollan en las últimas décadas de la vida, hasta que la esperanza de vida no comenzó a incrementarse (esto es, desde mediados del siglo XIX), el número de personas que alcanzaban una edad suficiente para que se manifieste la enfermedad era relativamente pequeño. Ahora que las enfermedades infecciosas, la principal causa de muerte en el pasado, han sido relativamente controladas por mejoras en la salud pública y en la medicina, la proporción de personas con riesgo de padecer cáncer se ha incrementado drásticamente¹.

El cáncer proviene de un desorden celular y aunque, generalmente, aparece como un tumor constituido por una masa de células, el tumor visible es el resultado final de toda una serie de cambios, los cuales pueden desarrollarse durante años¹. La tumorigénesis es un proceso de muchos pasos que reflejan alteraciones que conducen a la transformación progresiva de células normales en células altamente malignas².

Los genomas de las células tumorales se encuentran alterados en múltiples sitios; dichas células sufren frecuentemente mutaciones puntuales en su ADN y cambios cromosómicos³.

La transformación de células en cultivo es, en sí mismo, un proceso de muchos pasos. Las células de roedores requieren, como mínimo, la introducción de dos cambios genéticos antes de adquirir potencial tumorigénico; mientras que las células humanas

son aún más difíciles de transformar⁴. Observaciones de tumores en humanos y en modelos animales muestran que el desarrollo tumoral procede vía un proceso análogo a la evolución Darwiniana. Es decir, una sucesión de cambios genéticos que confieren algún tipo de ventaja en el crecimiento, llevan a la conversión progresiva de células humanas normales en células tumorales⁵.

En la iniciación del cáncer desempeñan un papel fundamental dos clases de genes que, en sus versiones normales, controlan principalmente el ciclo celular. Los proto-oncogenes favorecen el crecimiento celular; mientras que los genes supresores de tumores lo inhiben. Considerados en su conjunto, estos dos tipos de genes son responsables, en gran medida, de la proliferación celular descontrolada que se observa en los tumores. Cuando los proto-oncogenes mutan, pueden convertirse en oncogenes carcinogénicos capaces de dirigir una multiplicación desenfrenada. Las mutaciones pueden hacer que el proto-oncogén produzca en exceso alguna proteína estimuladora del crecimiento, o una forma hiperactiva de la misma. Los genes supresores de tumores, por el contrario, contribuyen al cáncer cuando las mutaciones los silencian. La falta de proteína supresora funcional priva a la célula del freno que, en situación de normalidad, impide el crecimiento desmesurado^{1,6}.

Es importante resaltar que, a la fecha, se han descrito más de 100 oncogenes con capacidad transformante *in vitro* y que, la mayoría son genes relacionados con el ciclo celular, la proliferación celular, los factores de crecimiento, así como, con las múltiples rutas de transducción de señales. La pérdida de control de los mismos puede asociarse a una ventaja de crecimiento que finalmente confiere la actividad transformante.

Por lo tanto, se puede decir que la formación de tumores humanos es muy compleja y requiere la acumulación de múltiples alteraciones oncogénicas⁷⁻¹⁰. Dichas alteraciones moleculares van asociadas al desarrollo de los tumores, que en su mayoría, muestran una progresión histopatológica desde lesiones incipientes, con grados de displasia y atipia variables, tumores “benignos”, carcinomas intraepiteliales, hasta tumores infiltrantes y finalmente con diseminación metastásica.

1.2 CRECIMIENTO TUMORAL

1.2.1 Etapas en el desarrollo del cáncer

El desarrollo de un tumor comienza cuando una célula de una población normal sufre una o más mutaciones genéticas que favorecen la supervivencia y la proliferación de la misma. De esta manera, dicha célula, se convierte en la progenitora de una descendencia celular que crecerá en exceso, experimentando así, un fenómeno conocido como *hiperplasia*. Si, además de una proliferación desmesurada, la progenie celular presenta un aspecto anormal en su morfología y orientación se dice que el tejido presenta *displasia*. Transcurrido cierto tiempo, pueden ocurrir nuevas mutaciones que seguirán alterando el comportamiento celular. Las células afectadas presentarán anomalías crecientes en su desarrollo y aspecto. Como se describe más adelante, en determinado momento, el tumor, para poder seguir creciendo, adquiere la capacidad de generar vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes cercanos al mismo en un proceso conocido como angiogénesis. El aporte de sangre le permite al tumor el poder seguir aumentando de tamaño ya que las células reciben oxígeno y nutrientes a través de estos nuevos vasos y así pueden seguir proliferando. Si el tumor aún no traspasa ninguna barrera para invadir otro tejido se habla de un cáncer *in situ*. El tumor puede permanecer así indefinidamente; sin embargo, algunas células pueden sufrir nuevas mutaciones. Si los nuevos cambios genéticos facilitan la invasión, por el tumor, de tejido circundante y la entrada de células tumorales en el torrente sanguíneo o linfa, se califica como maligna la masa tumoral y se habla de cáncer *invasivo* (**Figura 1**). Las células invasoras pueden entonces, iniciar nuevos tumores en otras partes del cuerpo (metástasis). En la actualidad se ha hipotetizado un modelo distinto para la capacidad de las células de volverse invasivas¹¹. Dicho modelo sostiene que alguna de las mutaciones adquiridas relativamente temprano en la tumorigénesis conferirían, no solamente una ventaja replicativa, sino también, más adelante en la progresión tumoral, la capacidad para generar metástasis.

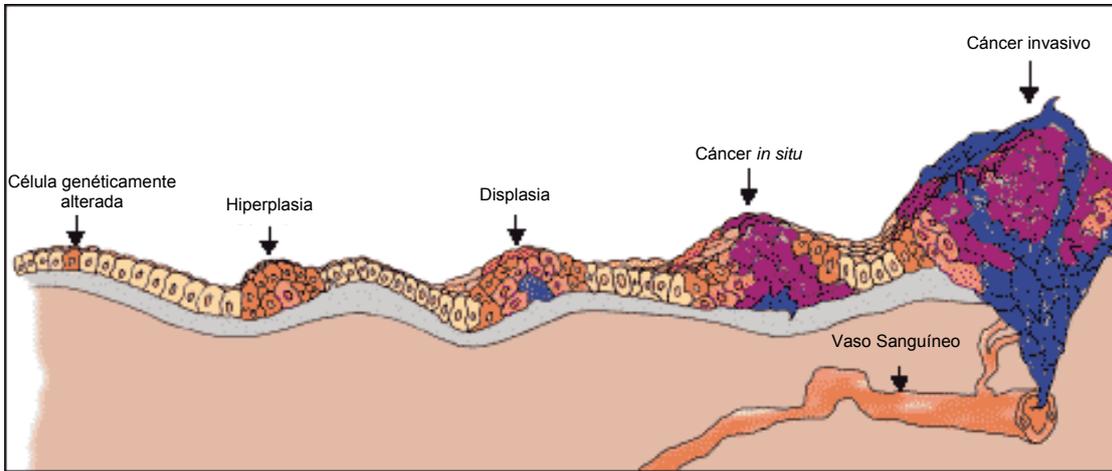


Figura 1: Etapas en el desarrollo de un tumor. (Adaptado de <http://science.education.nih.gov/supplements/nih1/cancer/guide>).

1.2.2 Características biológicas de las células tumorales

Las células tumorales tienen defectos en los circuitos regulatorios que gobiernan la proliferación celular normal y la homeostasis. Ha sido sugerido² que la gran variedad de genotipos diferentes de las distintas células tumorales son una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que, colectivamente, llevan al crecimiento maligno. Dichas alteraciones adquiridas esenciales *intrínsecas* son:

- Independencia de factores de crecimiento
- Insensibilidad frente a señales antiproliferativas
- Evasión de la muerte celular programada (apoptosis)
- Potencial replicativo ilimitado
- Angiogénesis sostenida
- Invasión de tejidos y metástasis.

Por otro lado, cabe mencionar, que en los últimos años se ha incorporado una séptima característica que deben poseer las células tumorales para llegar a generar cáncer y que se la menciona como *extrínseca* porque, ya no solo depende de la propia célula tumoral sino también del sistema inmune del organismo portador¹². Esta otra característica que debe ser tenida en cuenta es:

➤ Evasión de la inmunovigilancia

A continuación se menciona brevemente en que se caracterizan estas alteraciones esenciales que poseen prácticamente todas las células tumorales.

1) Independencia de factores de crecimiento: Mientras una célula normal necesita una serie de señales de crecimiento transmitidas por receptores transmembrana, una célula transformada genera sus propias señales de crecimiento. Dicha independencia puede darse por producción de factores de crecimiento por parte de la misma célula tumoral, por alteraciones en la expresión de receptores de factores de crecimiento, por cambios en los niveles de expresión o por activación de moléculas de señalización y factores de transcripción^{2,13}. Este caso está perfectamente ejemplificado por el gen *c-erbB-2*, capaz de activar la ruta de señalización de MAPK (SOS-Ras-Raf-MEK-MAPK) generando señales mitogénicas en ausencia de factores de crecimiento.

2) Insensibilidad frente a señales antiproliferativas: En un tejido normal, múltiples señales antiproliferativas operan para mantener a las células en un estado quiescente y para mantener la homeostasis tisular. Existen inhibidores solubles (por ej: TGF- β) que ayudan a mantener la quiescencia y que previenen que células dañadas progresen en el ciclo celular o que aumente la proliferación cuando las condiciones ambientales son inapropiadas. Las mayores respuestas celulares para evitar la proliferación descontrolada son el arresto del ciclo celular (en G0 o en G1) o la muerte celular programada (apoptosis). El arresto del ciclo celular provee el tiempo necesario para reparar y la apoptosis para eliminar a las células dañadas¹. Las células tumorales están obligadas a escapar a este tipo de control para poder proliferar. Existen varios genes supresores de tumores involucrados en mantener el punto de control (checkpoint) G1.

Cabe destacar la importancia de las proteínas Rb (retinoblastoma) y p53 en la capacidad de arrestar el ciclo celular. En un gran número de tumores existen alteraciones, directas o indirectas, sobre estas proteínas u otras que interactúan con ellas para llevar a cabo su función.

3) Evasión de la muerte celular programada (apoptosis): La habilidad de un tumor para crecer en número de células, no viene dada solo por la tasa de replicación, sino por el balance entre ésta y la tasa de mortalidad. La resistencia al proceso de apoptosis es una característica de la mayoría, sino de todos, los tumores. Las células tumorales poseen varias estrategias por las cuales pueden desarrollar resistencia al proceso de apoptosis. Existe toda una gama de factores y de receptores que transmiten las señales de muerte; ejemplos clásicos de esto son el receptor Fas y Fas ligando, el TNF- α y el TNFR1, entre otros. Existen, por otro lado, receptores denominados señuelos (en inglés *decoy receptors*) que carecen de los dominios de señalización. Muchos tumores sobreexpresan dichos receptores señuelos, los cuales pueden secuestrar factores de muerte presentes en el medio y promover la supervivencia de las células tumorales¹⁴. Existen también moléculas encargadas de monitorear daños en el ADN de la célula o anomalías en el entorno que son capaces de iniciar el proceso de apoptosis. La estrategia más común utilizada por las células tumorales para evadir la apoptosis es la anulación de la función de reguladores pro-apoptóticos. El caso más citado es el de la proteína p53 que se encuentra mutada en más del 50% de los tumores humanos¹⁵ y que es una molécula encargada de activar proteínas que intervienen en la reparación del ADN, en caso de daño, y encargada de iniciar la apoptosis si el daño en el ADN es irreparable. Más adelante en esta tesis se describirá de manera más detallada el proceso de apoptosis vinculado con el cáncer.

4) Potencial Replicativo Ilimitado: Las células normales presentan un número limitado de replications antes de entrar en lo que se conoce como senescencia y morir por apoptosis. Esto se debe a la presencia de secuencias de ADN no codificante conocidas como telómeros en los extremos de los cromosomas. Los telómeros están compuestos por varias miles de repeticiones de una secuencia de 6 pares de bases (pb), durante cada ciclo celular se pierden entre 50 y 100 pb teloméricas de los extremos de

cada cromosoma. Este acortamiento progresivo de los telómeros durante los sucesivos ciclos de replicación lleva a la muerte de la célula por apoptosis cuando el telómero alcanza una longitud crítica¹⁶. Sin embargo, la mayoría de las células tumorales que se mantienen en cultivo son inmortales. El mantenimiento de los telómeros es evidente en casi todos los tipos de células malignas y esto se debe a que, la gran mayoría de las mismas, expresan la enzima telomerasa¹⁷. Dicha enzima está formada por un complejo proteína - ácido ribonucleico con actividad polimerasa y es producida en células germinales embrionarias; pero su expresión es reprimida en las células somáticas maduras. Sin embargo, la gran mayoría de las células tumorales son capaces de activar su expresión y por lo tanto mantener los telómeros con una longitud superior a la longitud crítica permitiendo esto, que las células puedan replicarse de manera ilimitada.

5) Angiogénesis sostenida: El oxígeno y los nutrientes suministrados por los vasos sanguíneos son cruciales para el buen funcionamiento y la supervivencia celular; por lo tanto, todos los tumores, necesitan un nuevo suministro de sangre para poder crecer en tamaño¹⁸. Una de las características de las células tumorales es que pueden activar el proceso de angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes) por varios mecanismos. En este proceso, es importante el balance entre factores inhibidores y activadores de la angiogénesis. En muchos tumores se ha descrito una sobreproducción de el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y/o de los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs). VEGF y FGFs 1 y 2 son potentes moléculas estimuladoras que señalizan vía receptores celulares endoteliales y son potentes mitógenos para células endoteliales. En otros tumores, se observó una disminución de la expresión de inhibidores endógenos de la angiogénesis como la trombospondina-1 o interferón- β ^{19,20}. También ha sido descrito que las proteasas pueden controlar la biodisponibilidad de activadores e inhibidores angiogénicos^{21,22} y que; por lo tanto, son moléculas importantes en la activación o no de este mecanismo.

6) Invasión de tejidos y metástasis: Tarde o temprano, durante el desarrollo de la mayoría de los cánceres humanos, en el tumor primario se generan células que son capaces de invadir tejidos adyacentes, de penetrar al torrente sanguíneo y viajar a órganos distantes en el cuerpo donde pueden anidar formando nuevos focos tumorales².

Estos establecimientos distantes de células tumorales (metástasis) son la causa del 90% de las muertes por cáncer en humanos²³. Este complejo proceso ocurre solamente cuando el tumor ya ha adquirido todas las características previamente enumeradas. Existen varios tipos de proteínas implicadas en mantener a las células en su correspondiente lugar en un tejido que se encuentran alteradas en las células con potencial metastásico e invasivo. Dichas proteínas incluyen moléculas de adhesión célula - célula (CAMs, Cadherinas) y célula - matriz extracelular (principalmente integrinas). Es importante destacar, que todas estas interacciones de “adherencia” transportan además señales regulatorias a la células²⁴. Una de las alteraciones más observadas relacionadas con la metástasis involucra a la E-cadherina. La función de adhesión de la misma se encuentra claramente disminuida en la mayoría de los cánceres de origen epitelial. Son también evidentes los cambios que existen en la expresión de integrinas en las células invasivas y metastásicas. La exitosa colonización de nuevos sitios (tanto cercanos como distantes) por parte de las células tumorales demanda una adaptación, la cual es adquirida a través de cambios en el espectro de las subunidades α y β de las integrinas expresadas por dicha célula. Estas permutaciones resultan en la expresión de diferentes subtipos de integrinas que poseen distintos sustratos²⁵. Otro parámetro a tener en cuenta en el proceso de invasión y metástasis es la presencia de proteasas extracelulares capaces de degradar la matriz extracelular. En muchos tumores epiteliales, dichas proteasas, no son producidas por las células tumorales; sino por las células estromales y por células inflamatorias presentes en la zona²⁶. La activación de proteasas extracelulares y las alteraciones de las cadherinas, CAMs, e integrinas son centrales en la adquisición del potencial metastásico e invasivo por parte de las células tumorales.

7) Evasión de la inmunovigilancia: Los tumores desarrollan distintas estrategias para evadir la inmunovigilancia (es decir la capacidad del sistema inmune del organismo de detectar y eliminar células tumorales). Estas estrategias parecen no estar relacionadas con las otras características de la carcinogénesis ya mencionadas y resultan de la presión selectiva ejercida por el sistema inmune¹². La relación existente entre el sistema inmune y el cáncer será detallada en el próximo capítulo de la presente tesis.

2. RESPUESTA INMUNE Y CÁNCER

2.1 RESPUESTA INMUNE

El sistema inmune esta constituido por células y moléculas que coordinan su acción frente a la entrada de sustancias ajenas al organismo o “señales de peligro”. La respuesta inmune se puede dividir en dos categorías: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa o adquirida.

Todos los componentes celulares del sistema inmune derivan de un progenitor común alojado en la medula ósea llamado precursor hematopoyético pluripotente. A partir de esta célula se originan otros dos precursores: el mieloide y el linfoide. El precursor mieloide da origen a los granulocitos, macrófagos y mastocitos mientras que el precursor linfoide da origen a las células natural killer (NK) y a los linfocitos T y B. Para el caso de las células dendríticas (CDs) el concepto actual es considerarlas como una familia de células derivadas de precursores mieloides y linfoides²⁷.

2.1.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo y permite controlar a la mayor parte de los agentes patógenos. Se caracteriza por la baja especificidad, la escasa diversidad para el reconocimiento de antígenos extraños y por la falta de memoria inmunológica. Los principales componentes de este tipo de respuesta son las barreras físicas y químicas, constituidos por la piel y mucosas, y las sustancias antimicrobianas; las proteínas de la sangre, incluyendo el sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; las células fagocíticas, principalmente los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (CDs) y otros leucocitos, como las células NK, los linfocitos T (LT) $\gamma\delta$ ²⁸ y los linfocitos B1 productores de anticuerpos naturales²⁹. Los neutrófilos serán descritos en profundidad más adelante en este trabajo.

Una de las propiedades claves de la respuesta inmune innata es que puede reconocer estructuras moleculares conservadas de microorganismos. Para lograr esto utiliza receptores como los “Toll-like receptors” (TLR) que se encuentran en los macrófagos y las CDs o como proteínas solubles del suero. El reconocimiento de estructuras moleculares conservadas por estos receptores envía una “señal de peligro” al sistema inmune que activa mecanismos efectores no específicos, como la activación del sistema complemento o la producción de citoquinas por parte de los macrófagos y las CDs. Sin embargo, el reconocimiento de estructuras conservadas de patógenos también activa la respuesta inmune adaptativa³⁰. Las células clave en mediar la interacción entre la respuesta inmune innata y la adaptativa son los macrófagos y las CDs, que detectan “señales de peligro” y se encuentran en casi todos los tejidos.

2.1.2 Inmunidad adaptativa

La respuesta inmune adaptativa se caracteriza por presentar una alta especificidad, tener una gran diversidad para el reconocimiento de moléculas y desarrollar una memoria inmunológica. Los componentes celulares de este tipo de respuesta son, principalmente, los $LT\alpha\beta$ y los LB2.

Los LT se dividen en células T colaboradoras ($CD4^+$) y células T citotóxicas ($CD8^+$). Ambas clases de linfocitos cumplen distintas funciones y presentan receptores específicos para el reconocimiento antigénico.

Las células que participan en la respuesta inmune se encuentran organizadas formando tejidos y órganos linfáticos. Es en estos órganos linfáticos donde los linfocitos pueden interactuar con células no linfoides que son importantes tanto para el desarrollo del sistema inmune como para la iniciación de la respuesta inmune. Los principales órganos linfoides se clasifican en primarios, donde se generan los linfocitos y se produce la selección negativa de los clones autoreactivos, y órganos linfoides secundarios, donde se inicia la respuesta inmune adaptativa. Los órganos linfoides primarios son la médula

ósea, donde se originan los LB y LT, y el timo donde maduran los LT. Los LB maduran directamente en la médula ósea.

Una vez concluida la maduración en los órganos linfáticos primarios los LB y LT vírgenes, es decir, aquellos que aún no han entrado en contacto con un antígeno, circulan continuamente desde la sangre hacia los tejidos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo, tejido linfoide asociado a mucosas). En presencia de un agente infeccioso, los linfocitos que reconocen el antígeno quedan retenidos en el tejido linfático secundario donde se activan, proliferan y se diferencian en células efectoras, proceso que lleva varios días. Luego estas células efectoras migrarán hacia las zonas de inflamación para eliminar al agente infeccioso.

Sin embargo, el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos requiere la intervención de un tipo especial de células denominadas células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales que tienen la capacidad de presentar antígenos en su superficie celular en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o de clase II. Estas células captan y procesan antígenos pertenecientes a agentes infecciosos o antígenos propios que luego son presentados a los linfocitos. Los clones de linfocitos que pudieron reconocer al antígeno, a través de sus receptores específicos, se activan y comienzan a proliferar. Según el tipo de microorganismo y el microambiente, el sistema inmune desencadenará una respuesta adaptativa de tipo humoral o celular^{31,32}.

Tanto los mecanismos de respuesta inmune innata como los de la adaptativa forman un sistema de defensa que funciona cooperativamente. La inmunidad innata no sólo provee una primer defensa contra los agentes patógenos, sino que también juega varios roles importantes en la inducción y modulación de la respuesta inmune adaptativa (**Figura 2**).

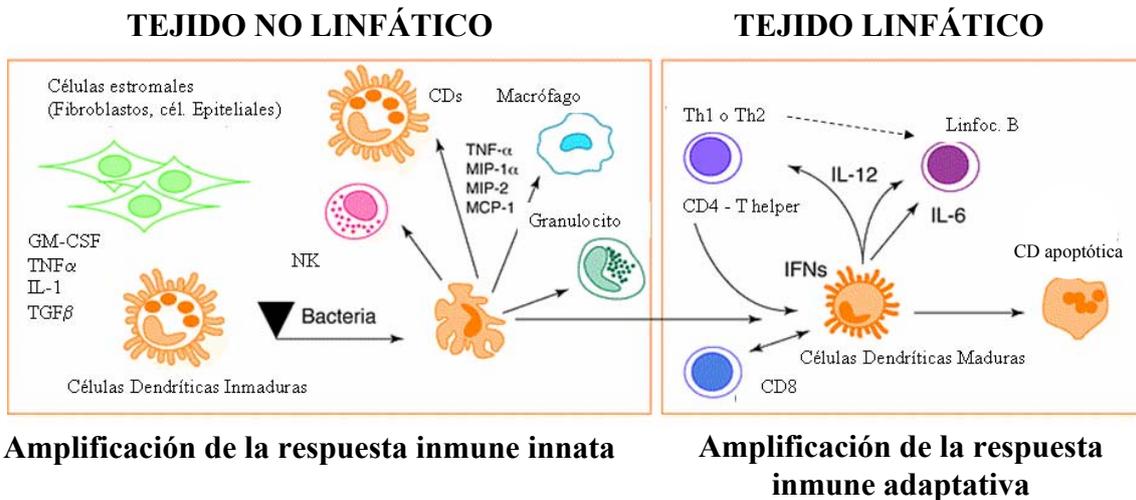


Figura 2. Células que participan de la respuesta inmune. El sistema inmune consta de dos tipos de respuestas: la innata y la adaptativa. Las dos respuestas no son independientes entre sí sino que se encuentran íntimamente relacionadas.

2.1.3 Desarrollo de la respuesta inmune adaptativa

Las células presentadoras de antígeno profesionales son una población heterogénea de leucocitos con capacidad inmunoestimuladora, que incluyen a los monocitos/macrófagos, los LB y las CDs, cuya principal función es procesar y presentar los antígenos a las células T. Estas células presentan características comunes en cuanto a su capacidad para incorporar y procesar antígenos, pero se diferencian en su capacidad presentadora.

Las células dendríticas tienen una amplia distribución por todo el organismo y son las principales CPA profesionales ya que son las únicas capaces de generar una respuesta inmune primaria. Se encuentran principalmente en piel, ganglios linfáticos, bazo y timo. Además se caracterizan por la presencia de determinados marcadores de superficie y por su morfología. Los marcadores más característicos que poseen son: moléculas de MHC de clase I y de clase II; moléculas CD1a, CD1b y CD1c; moléculas accesorias como CD40, CD44, CD11a, CD58 y CD54 y moléculas coestimuladoras como CD80 y

CD86, entre otras. La expresión de estos marcadores depende del microambiente donde se encuentran y del estado de maduración de las CDs³³.

Las células dendríticas se originan a partir de un precursor mieloide o linfoide en la médula ósea. Sus precursores mieloides circulan por la sangre dirigiéndose hacia los tejidos periféricos donde permanecen como CDs inmaduras. En cambio sus precursores linfoides circulan por la sangre e ingresan directamente en los órganos linfáticos secundarios. Las CDs inmaduras se caracterizan por su alta capacidad para capturar y procesar antígenos y por su baja capacidad para estimular linfocitos. La captación de antígenos esta mediada por procesos de macropinocitosis, endocitosis mediada por receptores y fagocitosis. Este proceso de captación es muy eficiente. En presencia de un agente infeccioso y de mediadores inflamatorios las CDs inmaduras, sufren cambios que les permiten interactuar y activar a los linfocitos estimulando la linfoproliferación. Como primera modificación pierden su capacidad endocítica y aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80/CD86 y moléculas del MHC de clase I y de clase II. Además modifican la expresión de receptores de quimoquinas lo que les permite migrar hacia los ganglios linfáticos más próximos donde se encuentran con los linfocitos.

Las CDs maduras son eficientes estimuladoras de los LB y LT. Las células B pueden reconocer directamente a los antígenos a través de sus receptores, sin embargo, los LT necesitan que el antígeno sea procesado y presentado por las CPA en el contexto de la molécula del MHC. El receptor de las células T reconoce fragmentos del antígeno unido a moléculas de MHC sobre la superficie de las CPA. Los péptidos unidos a MHC de clase I estimulan a las células T citotóxicas (LTc), mientras que los péptidos unidos a MHC de clase II estimulan a las células T colaboradoras (LTh).

Luego de la maduración, las CDs migran hacia los ganglios linfáticos más próximos en donde se encuentran con los LT naïve. La activación de los LT comienza cuando el complejo receptor de linfocitos T (TCR) reconoce un péptido específico alojado en el surco de unión al péptido de la molécula de MHC presente en la superficie de la CPA. Además, para que la activación sea eficiente es necesaria la presencia de moléculas

coestimuladoras en la superficie de las CPA como CD80 y CD86 que interactúan con CD28 presente en la superficie del LT. Estas dos señales MHC-péptido-TCR y CD80/CD86-CD28 inducen la activación del LT. A su vez, los LT activados enviarán señales a las CPA, a través de la liberación de citoquinas y la expresión de moléculas de superficie como CD40, activándolas e induciendo una mayor expresión de MHC de clase I y II; facilitando de esa manera la presentación antigénica.

Al activarse los LT no sólo se expanden sino que también se diferencian a células efectoras capaces de mediar diferentes acciones. Mientras que la activación de los LT CD8⁺ conduce a su diferenciación en linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, la activación de los LT CD4⁺ puede llevar a su diferenciación en cuatro perfiles diferentes:

- Células Th1
- Células Th2
- Células Th17
- Células T reguladoras (T_{reg})

La decisión sobre el tipo de célula al que se va a diferenciar el LT CD4⁺ virgen ocurre luego del reconocimiento antigénico (sobre células que expresen MHC de clase II), durante la expansión clonal y esta es determinada por el microambiente de citoquinas presentes en el medio. Por ejemplo, la presencia de IL-12 induce la diferenciación a un perfil Th1; en cambio la presencia de IL-4 induce la diferenciación a Th2. Recientemente se han incorporado las poblaciones Th17 y T_{regs}. Aparentemente, para que se induzca la producción de Th17 serían necesarias las citoquinas TGF-β + IL-6; en cambio en ausencia de IL-6, TGF-β induciría T_{regs}. Este esquema es una simplificación de lo que realmente ocurre *in vivo*, ya que se ha demostrado que otras citoquinas como IL-18, IL-21, IL-23, IFN-γ, entre otras, participan en la polarización de las diversas respuestas celulares T³⁴.

Una vez generado un determinado patrón de células T colaboradoras, éstas comenzarán a producir un patrón de citoquinas característico. Las células Th1 producen fundamentalmente IFN-γ e IL-2, y también TNF-β. Las células Th2 producen principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Ambas poblaciones comparten la

capacidad de producir ciertas citoquinas como la IL-3 y el factor estimulante de colonias para granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Por otro lado las células Th17 expresan IL-17 e IL-22³⁵.

Independientemente del tipo de respuesta T generada, es interesante remarcar el rol central de las CD4 en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Estas células serán capaces de desarrollar respuestas citotóxicas, pro-inflamatorias (Th1), respuestas humorales (a través de Th2 activando a los LB, colaboración T-B), respuestas autoinmunes (Th17) o respuestas supresoras (Treg).

2.2 INMUNOBIOLOGÍA TUMORAL

2.2.1 Inmunovigilancia

La teoría de la inmunovigilancia fue postulada originalmente por Burnet y Thomas a mediados del siglo XX. Estos autores propusieron que en el organismo se desarrollan frecuentemente tumores y que la mayoría de las veces éstos son eliminados por el sistema inmune¹. Dichos autores sostenían esta hipótesis basándose en una cierta cantidad de hechos experimentales observados que se podrían resumir así: (1) la mayoría de las células malignas tienen cualidades antigénicas que las diferencian del tipo celular del cual derivan, (2) esas diferencias antigénicas pueden ser reconocidas por células T y provocar una respuesta inmune. De ser esto así debería ocurrir que (3) la incidencia del cáncer debería ser mayor en períodos en que el sistema inmune funciona con menos eficacia, particularmente en el período neonatal y de edad avanzada, (4) la inmunosupresión debería aumentar la incidencia de cáncer, (5) podrían ocurrir regresiones espontáneas de tumores y debería observarse evidencias de una respuesta inmune en estos casos, y (6) un examen histológico más amplio podría mostrar que existen más tumores de los que son clínicamente aparentes¹.

La introducción de la teoría de la inmunovigilancia fue seguida rápidamente de la realización de muchos experimentos en todo el mundo, destinados a probar si sus

hipótesis eran correctas. Dentro de los primeros experimentos realizados se destacan los estudios efectuados con ratones atímicos en los cuales no se observaron incrementos generales en la frecuencia de aparición de tumores; sin embargo muchos de esos ratones desarrollaron cáncer al ser infectados accidentalmente por el virus del polio que, raras veces causa tumores en los animales normales³⁶. Esto, parecía sugerir que el sistema inmune estaba involucrado en la protección frente a la infección por virus oncogénicos más que en la protección frente al desarrollo de tumores. Un resultado similar se observó con animales depletados de linfocitos por tratamiento con suero anti-linfocitario³⁷. Por esto, durante muchos años, fue puesto poco interés en la posibilidad de que el sistema inmune pudiera prevenir el desarrollo de tumores no inducidos por virus y la inmunovigilancia fue prácticamente olvidada.

Sin embargo, experimentos más recientes generaron un renovado interés en el proceso de inmunovigilancia. Particularmente cabe destacar el experimento llevado a cabo con ratones C57BL/6 carentes de perforina (perforina^{-/-}) que resultaron más sensibles a formar tumores inducidos por el carcinógeno metilcolantreno (MCA)³⁸. La perforina es un componente de los gránulos citolíticos de las células T citotóxicas y de las células NK que es importante para causar la muerte de las células blanco de estos linfocitos. Después del desafío con MCA, los ratones perforina^{-/-} desarrollaron significativamente más tumores comparados con los ratones perforina^{+/+} tratados de la misma manera³⁹. Resultados similares se obtuvieron utilizando animales *knock out* para el receptor de IFN- γ ⁴⁰. También, estudios epidemiológicos en humanos muestran una correlación positiva entre la presencia de linfocitos en un tumor y el aumento de la supervivencia de los pacientes⁴¹⁻⁴⁴.

Observaciones histopatológicas muestran la presencia de infiltrados leucocitarios que sugieren que los tumores son inmunogénicos, ya que, muchas veces, pueden verse en el área tumoral linfocitos T, macrófagos y neutrófilos entre otros. Otra apreciación histopatológica que sugiere la estimulación de la respuesta inmune por parte de los tumores es la observación frecuente de proliferación linfocitaria en los ganglios linfáticos que drenan los sitios de crecimiento tumoral.

Por otro lado, que exista dicha respuesta inmune sugiere que los tumores poseen antígenos reconocidos como extraños por el sistema inmune^{1,45}.

2.2.2 Antígenos tumorales

Como ya se mencionó con anterioridad, los mecanismos de la oncogénesis involucran alteraciones estructurales de genes, algunos de ellos implicados en diferenciación y/o proliferación. Esto daría lugar a la aparición de proteínas alteradas que podrían ser vistos por el sistema inmune como verdaderos antígenos. En general los antígenos tumorales se pueden dividir en:

Antígenos específicos de tumores (TSA): Son antígenos que solo aparecen en tumores y por tanto son exclusivos de esas células malignas. Generalmente se asocian a mutaciones. La mayoría de estos antígenos se han encontrado en modelos murinos de tumores inducidos por carcinógenos, y son escasos los definidos en tumores humanos. Se pueden citar como ejemplos:

- 1) Antígenos de origen viral. Es conocido que un grupo importante de tumores, como el papiloma humano, presentan una fuerte asociación con virus y expresan una serie de productos virales. En algunos casos se ha podido demostrar la existencia tanto de anticuerpos como de linfocitos T sensibilizados frente a estos productos. Estos antígenos son siempre específicos del tipo de virus inductor del tumor, independientemente del tipo de célula o tejido en donde se desarrolla el tumor.
- 2) Idiotipos. Los idiotipos de las inmunoglobulinas de superficie de las neoplasias de células B, así como los del TCR en los linfomas T se consideran antígenos específicos de tumor frente a los cuales es posible el desarrollo de una estrategia de inmunoterapia

Antígenos asociados a tumores (TAA): Se trata de componentes celulares encontrados tanto en células normales como en tumorales; pero la expresión está aumentada y/o alterada en las células malignas. Dentro de estos antígenos se incluyen:

- 1) Antígenos procedentes de reactivación de genes embrionarios. Son antígenos producidos normalmente por células embrionarias o fetales y que por lo tanto no son expresados por las células de individuos adultos. Sin embargo, estos antígenos pueden

ser expresados por células tumorales en el adulto. Ejemplos clásicos son el antígeno carcinoembrionario y la α -fetoproteína.

2) Proteínas oncogénicas. Las mutaciones en el ADN que conducen a la aparición de un tumor pueden dar lugar a la expresión de proteínas modificadas que pueden constituir antígenos asociados o inclusive específicos de tumor.

2.2.3 Efectores de la respuesta inmune antitumoral

Los estudios histológicos practicados en tumores han mostrado que la mayoría de ellos contienen un notable infiltrado de células inflamatorias, en los cuales predominan habitualmente los linfocitos y los macrófagos; pero también pueden detectarse otras células, que incluyen a las células dendríticas, los granulocitos y los mastocitos⁴⁵.

Los mecanismos responsables de la acción citostática y citotóxica del sistema inmune son muy heterogéneos; por lo tanto, en esta sección, mencionaremos solo algunos de los aspectos más esenciales.

Acción antitumoral de los linfocitos T: Tanto las células CD4⁺ como las células CD8⁺ tienen capacidad para inducir resistencia contra el crecimiento tumoral, aunque por mecanismos distintos. Las células CD8⁺ ejercen un efecto antitumoral directo, debido a su capacidad citotóxica; mientras que el efecto mediado por células CD4⁺ se debe principalmente a la producción de citoquinas⁴⁶.

Acción antitumoral de las células NK: Las células NK poseen una importante capacidad de lisis de células tumorales *in vitro* e *in vivo*⁴⁷. Así, mediante la reconstitución con células NK de animales irradiados, se ha observado regresión de ciertos tumores. De igual manera, se ha demostrado en humanos, que suelen ser de mejor pronóstico aquellos tumores que se encuentran infiltrados con células NK.

Acción antitumoral de macrófagos: Los macrófagos son constituyentes importantes en el infiltrado celular de los tumores y pueden afectar al crecimiento tumoral por varias vías. Pueden influir directamente inhibiendo la proliferación de células tumorales, y

promoviendo también la formación de estroma; aunque, segregan citoquinas que favorecen la angiogénesis⁴⁸. Por otro lado, pueden atacar directamente a las células tumorales, sólo o en cooperación con otros mecanismos efectores.

Acción antitumoral de las CD8: Numerosos tumores humanos están infiltrados por CD8. Clásicamente se ha correlacionado este hecho con un pronóstico favorable de la enfermedad, dado que las CD8 podrían ser capaces de inducir y mantener una respuesta inmune apropiada capaz de inhibir el crecimiento tumoral y la posibilidad de dar metástasis. Aunque el mecanismo de acción de las CD8 que infiltran tumores aún no está del todo elucidado, el hecho de encontrarse en íntimo contacto con las células malignas sugiere una función captadora y presentadora de antígenos tumorales a las células efectoras de la respuesta inmune⁴⁹.

Acción antitumoral de los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs): Recientes estudios han sugerido que los neutrófilos cumplen un papel activo en la inmunovigilancia contra ciertos tipos de tumores. Esto depende de la clase y cantidad de citoquinas y factores quimiotácticos liberados naturalmente por las células tumorales y del grado de reclutamiento y activación de los PMNs infiltrantes⁵⁰. La relación entre los neutrófilos y el cáncer será detallada más adelante dada su importancia en relación a este trabajo de tesis.

Acción antitumoral de mediadores solubles de la respuesta inmune: Los factores solubles de la respuesta inmune cuya acción se ha demostrado más efectiva frente al desarrollo y crecimiento de las células tumorales son el IFN- γ , la IL-2 y el TNF- α . Con respecto al IFN- γ , cabe destacar que es un citoquina producida por las células T y NK que actúa sobre células del sistema inmune como macrófagos y linfocitos T citotóxicos (LTc) y cumple un papel fundamental dotando a un huésped inmunocompetente de los mecanismos de elaboración de respuestas celulares potentes contra el tumor (respuesta Th1 antitumoral)⁵¹.

2.2.4 Teoría de la inmunoección del cáncer

Una teoría postulada hace solo algunos años sostiene que la inmunovigilancia puede ser solo un componente dentro de un proceso más general denominado inmunoección del cáncer⁵². La inmunoección del cáncer es contemplada principalmente como el resultado de tres procesos: eliminación, equilibrio y escape (las tres Es de la inmunoección del cáncer, **Figuras 2 y 3**).

Eliminación: El proceso de eliminación abarca al concepto original de inmunovigilancia trabajando en conjunto con los mecanismos supresores de tumores intrínsecos de la célula como son la reparación del ADN o la inducción de apoptosis por daño al ADN o por la activación de ciertos oncogenes⁵³. En la primera fase del proceso de eliminación, una vez que los tumores sólidos alcanzan un determinado tamaño, comienzan a crecer de una manera más invasiva y se inicia entonces la producción de proteínas estromales y pro-angiogénicas generadas por las propias células tumorales¹⁸. El crecimiento invasivo causa pequeñas lesiones dentro del tejido circundante lo que induce señales inflamatorias que llevan al reclutamiento de células de la respuesta inmune innata (células NK, NKT, linfocitos T $\gamma\delta$, macrófagos y CDs)^{54,55}. Diversas estructuras presentes en las células transformadas son reconocidas por los linfocitos infiltrantes los cuales son entonces estimulados a producir IFN- γ . En la segunda fase el IFN- γ producido puede inducir la muerte de una cierta cantidad de células tumorales y también puede inducir la producción de quimoquinas (CXCL10, CXCL9, CXCL11) por parte de las mismas células tumorales y del tejido sano circundante; algunas de las cuales tienen potentes capacidades angiostáticas por lo que bloquean la formación de nuevos vasos dentro del tumor, esto produce aún más muerte de células tumorales. Las células tumorales necróticas son entonces fagocitadas por CDs inmaduras las cuales migran entonces al ganglio linfático drenante. Las quimoquinas producidas durante el proceso inflamatorio reclutan también más células NK y macrófagos. En una tercera fase, dichas células NK y macrófagos producen IL-12 e IFN- γ y matan aún más células tumorales por activación de mecanismos citotóxicos. En el ganglio linfático drenante, las CDs inducen LT CD4⁺ específicos del tumor que expresan IFN- γ (Th1) que, a su

vez, facilita el desarrollo de LT CD8⁺ específicos del tumor. En una cuarta fase los LT CD4⁺ y CD8⁺ específicos se dirigen al tumor donde los LT citotóxicos destruyen las células portadoras del antígeno tumoral⁵².

Equilibrio: En este proceso es cuando ocurre lo que se denomina inmunoselección. El sistema inmune del huésped y algunas células tumorales que han sobrevivido al proceso de eliminación entran en un equilibrio dinámico. Los linfocitos y el IFN- γ ejercen una potente presión de selección sobre las células tumorales que es suficiente para contener; pero no para eliminar completamente un tumor conteniendo muchas células genéticamente inestables y con una alta tasa de mutación. Durante este período de selección Darwiniana, muchas de las células tumorales son destruidas; pero, nuevas variantes se originan con nuevas mutaciones; de esta forma se generan células resistentes a las células efectoras del sistema inmune. Como el proceso de equilibrio involucra la eliminación continua de células tumorales y la producción de variantes resistentes por presión de selección ejercida por el sistema inmune, probablemente, éste sea el más largo de los tres procesos y pueda ocurrir durante un período de muchos años^{52,53}.

Escape: En este proceso es cuando ocurre lo que algunos autores denominan inmunosubversión¹² (que es una supresión activa de la respuesta inmune). Durante el mismo, las variantes tumorales que se han hecho insensibles a la detección y/o eliminación por parte del sistema inmune debido a cambios genéticos o epigenéticos comienzan a crecer y multiplicarse de una manera descontrolada. Esto resulta en la manifestación clínica de la enfermedad. Los mecanismos de escape tumoral se detallan en la próxima sección.

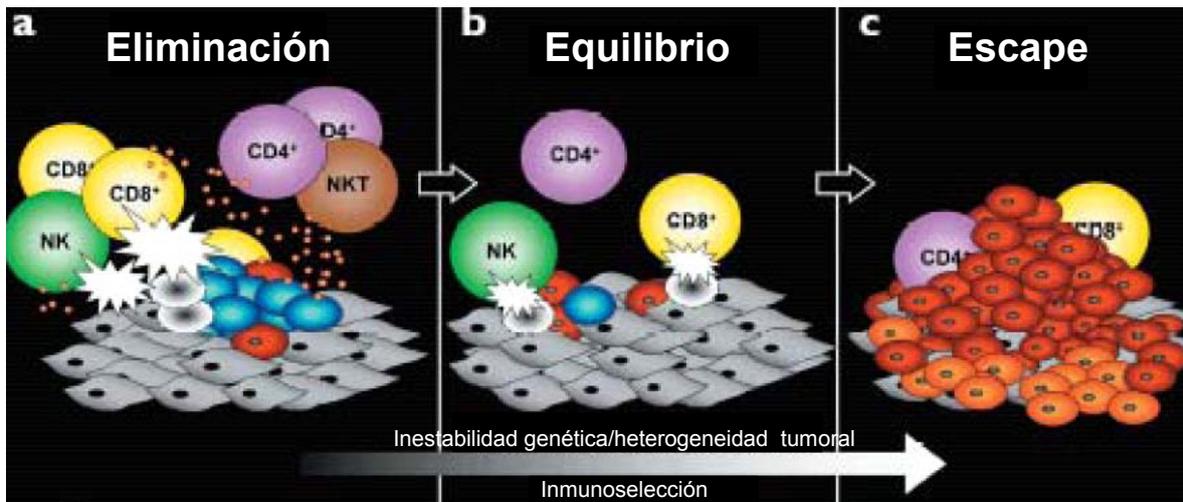


Figura 3. Los tres procesos involucrados en la inmunización del cáncer. (a) Eliminación es el proceso que involucra a la inmunovigilancia. (b) El equilibrio representa el proceso por el cual el sistema inmune selecciona y/o promueve la generación de variantes celulares tumorales capaces de sobrevivir al ataque del sistema inmune. (c) Escape es el proceso por el cual las células tumorales pueden evadir definitivamente al sistema inmune y multiplicarse de forma descontrolada. En a y b se muestran en azul las células tumorales sensibles al ataque inmune, en rojo variantes celulares tumorales y las células no transformadas en gris. En c se muestran variantes celulares tumorales adicionales que se han formado como resultado del proceso de equilibrio en naranja. Se muestran también diferentes poblaciones linfocitarias reclutadas al tumor. Los círculos naranja pequeños en a representan citoquinas y las estrellas blancas representan actividad citotóxica de los linfocitos contra las células tumorales (Adaptado de *Nature Immunology*⁵²).

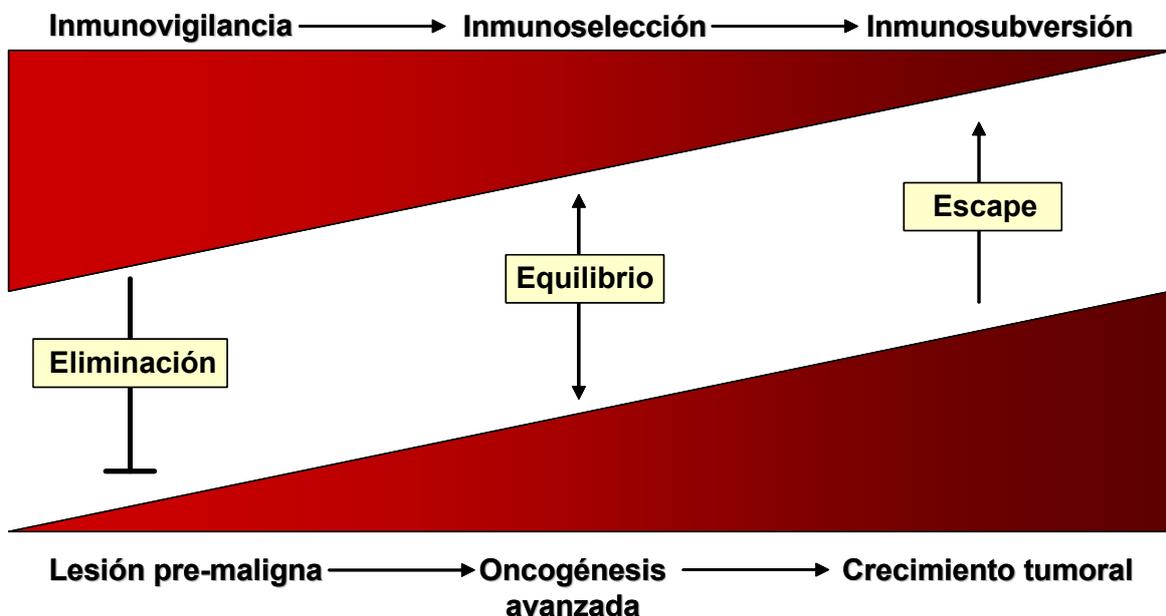


Figura 4. Relación entre los aspectos intrínsecos de las células tumorales y los efectos del sistema inmune del huésped (factores extrínsecos) en la carcinogénesis.

2.2.5 Mecanismos de escape tumoral

Los mecanismos por los cuales un tumor puede evadir la respuesta inmune del organismo se conocen como mecanismos de escape inmunológico o tumoral.

Los tumores desarrollan distintas estrategias para evadir la inmunovigilancia que resultan de la presión selectiva ejercida por el sistema inmune durante el proceso ya mencionado de inmunoselección.

Una estrategia común para eludir la respuesta inmune mediada por células T es la disminución o la pérdida de expresión de moléculas HLA de clase I en las células tumorales, de forma tal que no puedan formarse los complejos de péptidos del antígeno tumoral procesado y moléculas MHC necesarios para el reconocimiento por los LTc. Las alteraciones en los niveles de expresión de HLA posibilitan la exposición de nuevas variantes tumorales al ataque de células NK, cuyas funciones efectoras dependen del nivel de HLA-I expresado en la superficie de las células tumorales. Mientras los LTc reconocen péptidos antigénicos asociados con tumores presentados por HLA-I, las células NK son citotóxicas para aquellas células que han perdido la expresión de HLA-I, ya que se activan cuando la señal inhibitoria de HLA-I desaparece o es drásticamente inhibida. Por otra parte, la expresión de moléculas aberrantes de HLA-I actúa como señal inhibitoria de la lisis por NK, confiriendo un mecanismo de evasión del reconocimiento inmunológico⁵¹.

Por otro lado, los tumores que expresan complejos MHC de clase I - péptido que son reconocidos por los LTc del huésped pueden ser incapaces de activarlos por dos razones. La primera, debido a que la mayor parte de las células tumorales no expresan moléculas MHC de clase II, por lo tanto, no pueden activar directamente a las células T colaboradoras CD4⁺ específicas para el tumor. Si las células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales no infiltran estos tumores, captan y presentan antígenos tumorales y activan a las células colaboradoras adecuadamente, no se producirá la máxima diferenciación de los LTc antitumorales. La segunda razón, es que, la falta de

coestimuladores en las células tumorales puede deteriorar la activación de la célula T. La activación de los LTc requiere la coestimulación a través de moléculas de la superficie celular, como B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86), que generalmente, no están presentes en las células tumorales. La presentación del antígeno de la célula tumoral a las células T en ausencia relativa de coestimuladores puede inducir tolerancia periférica (anergia clonal) en los linfocitos T específicos del tumor³¹.

También las células tumorales pueden presentar un procesamiento antigénico defectuoso. En la formación de complejos MHC I - péptido y en el procesamiento de antígenos, los proteosomas generan, a partir de proteínas citosólicas, péptidos que luego son transportados al retículo endoplasmático por el transportador asociado con el procesamiento antigénico (la proteína TAP). TAP está compuesta por dos subunidades: TAP-1 y TAP-2. Deficiencias en cualquiera de sus componentes bloquean su función transportadora, reduciendo el repertorio de péptidos disponibles para unirse a moléculas nascentes del MHC I y disminuyendo la estabilidad y expresión en superficie de moléculas MHC de clase I en las células afectadas. En una gran variedad de líneas celulares y tejidos tumorales se describieron defectos en estos componentes de la vía endógena o biosintética de procesamiento antigénico⁵¹.

Otro de los mecanismos de evasión descritos clásicamente, es la inducción de inmunosupresión por parte de las células tumorales mediante la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, como TGF- β , que tienden a suprimir la respuesta inmune celular. En concordancia con estos hallazgos, numerosos estudios han demostrado que los linfocitos infiltrantes aislados de tumores sólidos humanos (TIL) son funcionalmente deficientes en comparación con los de la circulación periférica. Las deficiencias funcionales observadas en los TIL consisten en una ausencia total de la respuesta por mitógenos, antígenos extraños o aloantígenos, o bien defectos parciales en la proliferación, citotoxicidad antitumoral o producción de citoquinas⁵⁶. Otras investigaciones han mostrado la presencia de linfocitos T apoptóticos en tejidos tumorales donde la apoptosis de las células tumorales es indetectable, lo que indicaría que los TIL, en algunos casos, serían inducidos a entrar en apoptosis en el microambiente tumoral.

La muerte celular programada de las células tumorales es mediada al menos por dos mecanismos moleculares diferentes y de rápida acción. Uno de ellos, el mecanismo secretor, combina la acción de: perforinas (secretadas y capaces de generar poros en la membrana de la célula blanco) y granzimas (cosecretadas con las perforinas, penetran en la célula blanco a través de los poros generados por las perforinas e inducen la muerte celular). También las granzimas entran en las células blanco a través de mecanismos independientes de perforinas. En el segundo mecanismo un ligando de la superficie de membrana de la célula citotóxica (CD95L/FasL/Apo1L), miembro de la familia del TNF (factor de necrosis tumoral), se une con un receptor presente en la superficie de la célula blanco (CD95/Fas/Apo1) para inducir apoptosis. Ambos mecanismos conducen a la lisis apoptótica y desempeñan un papel importante en la vigilancia inmunológica mediando la citotoxicidad celular. Por lo tanto si existen alteraciones en estos mecanismos las células tumorales podrían evadir, también de esta forma, la inmunovigilancia. Así, se describió la pérdida parcial o completa del receptor CD95 o Fas en una gran variedad de tumores originados de tejidos que normalmente lo expresan. Al estar esos receptores, ausentes o bloqueados las células tumorales presentarán una sensibilidad reducida a la acción de los LTc creando sitios privilegiados de inmunosupresión⁵¹. También se ha observado disminución de la expresión o mutaciones de otros receptores de muerte, metilación o mutación del gen que codifica para la caspasa-8, y sobreexpresión del inhibidor de caspasa-8 (FLIP) en células tumorales⁵⁷. Por otra parte, también se ha demostrado la expresión de CD95L y TRAIL en distintas células tumorales. Por lo que se deduce que los tumores podrían usar estas moléculas como arma de “contraataque” induciendo la apoptosis de los linfocitos T. Más adelante se describirán con más detalle los mecanismos de inducción de apoptosis y de contraataque.

Por otro lado, varios productos tumorales pueden estar involucrados en la inmunosubversión (supresión activa de la respuesta inmune). Por ejemplo, algunos tumores (o células mieloides asociadas a tumores) sobreproducen óxido nítrico y poseen una actividad aumentada de arginasa-1; ambos efectos pueden inhibir la función de las células T⁵⁸. También, la degradación del triptofano por la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la cual es constitutivamente expresada por tumores, promueve resistencia al

rechazo de células tumorales por el sistema inmune. La IDO producida localmente puede bloquear la proliferación de células T CD8⁺ en el sitio del tumor, como también promover la apoptosis de las células T CD4⁺^{59,60}.

Ha sido demostrado en modelos murinos que las células T CD8⁺ específicas de tumor están activadas al inicio del crecimiento tumoral; pero esas células muestran una pérdida progresiva de su función citolítica en estadios posteriores. De manera similar, células T CD4⁺ específicas de tumor pierden progresivamente su actividad antitumoral; mientras que el número de células T_{reg} se incrementa con el avance de la enfermedad⁶¹⁻⁶³.

Por otro lado, en los tumores existen varios factores (como VEGF, IL-6, IL-10, TGF- β , óxido nítrico sintasa 2 (NOS2), arginasa-1, IDO, COX2, gangliósidos, etc.) que pueden inhibir la diferenciación, maduración y función de las CD8; por lo tanto, las CD8 locales tienden a mediar efectos inmunosupresores y a promover la diferenciación de células T_{reg} en lugar de mediar efectos inmunoestimulatorios⁶⁴.

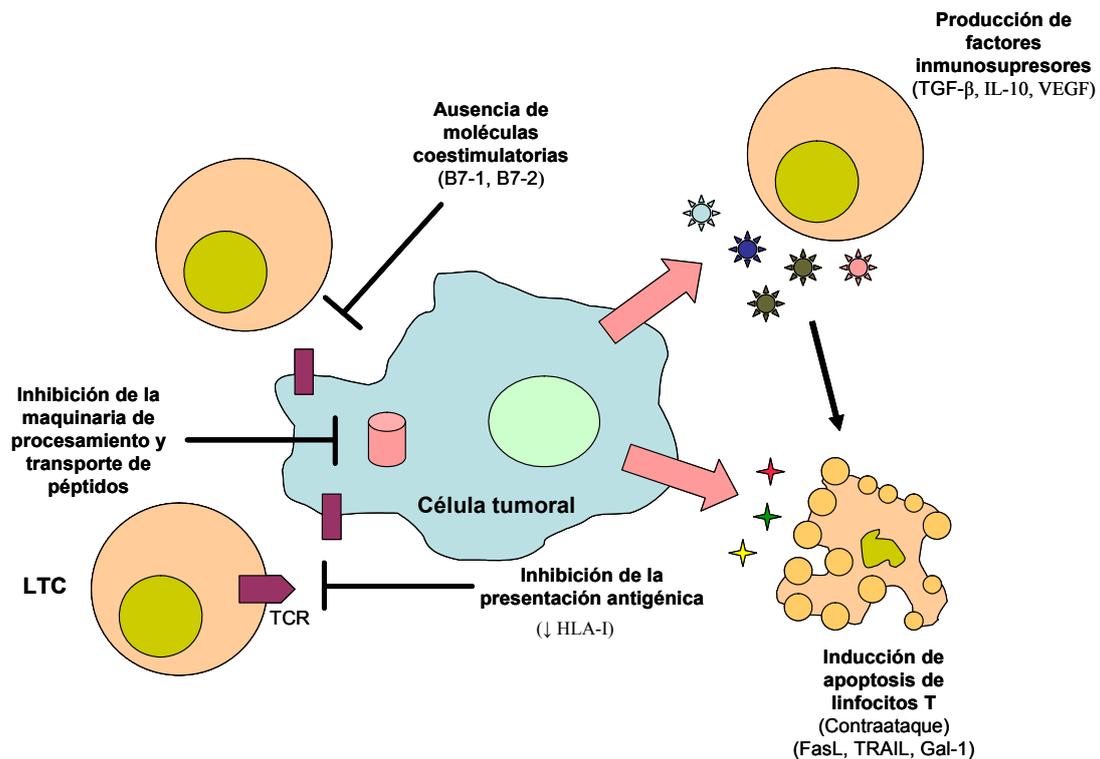


Figura 5. Mecanismos de escape tumoral. Se ilustran en la figura algunos de los mecanismos que utilizan los tumores para evadir a la respuesta inmune. (Adaptado de *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina*⁵¹).

Por todo lo expuesto en esta sección se puede deducir que; aunque una respuesta inmune antitumoral sea montada por el huésped, esta respuesta puede fallar en eliminar el tumor y, en el peor de los casos, ésta podría estimular la carcinogénesis y la progresión tumoral como resultado de la inflamación crónica generada.

2.3 LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES (PMN) Y CÁNCER

2.3.1 Leucocitos polimorfonucleares (PMN): Neutrófilos

Los neutrófilos pertenecen al grupo de leucocitos sanguíneos denominados granulocitos. Los granulocitos, llamados así debido a que contienen abundantes gránulos en su citoplasma, se clasifican en neutrófilos, basófilos y eosinófilos de acuerdo a las características de tinción de sus gránulos.

Los neutrófilos, también llamados leucocitos polimorfonucleares por su núcleo multilobulado y de variada morfología, son los granulocitos más abundantes en sangre periférica. Responden con rapidez a estímulos quimiotácticos, fagocitando y destruyendo patógenos y partículas extrañas. Los neutrófilos pueden ser activados por citoquinas producidas sobre todo por macrófagos y células endoteliales y se las considera la principal población celular en la respuesta inflamatoria aguda³¹.

Sus características principales son:

- Son los leucocitos sanguíneos circulantes más abundantes.
- Constituyen más del 90% de los granulocitos.
- Se producen en la médula ósea a razón de unos cien mil millones al día.
- Son de vida corta (2-3 días).
- Son circulantes, salvo cuando son reclutados a tejidos en inflamación.
- Su núcleo es multilobulado (de 2 a 5 lóbulos).
- Tras salir de la médula ósea, circulan por la sangre durante 7-10 horas, y luego pasan a tejidos, donde mueren, por apoptosis, a los 2-3 días.

Se han descrito cuatro tipos de gránulos presentes en los neutrófilos: i) *Gránulos azurófilos (primarios)*: son mayores y más densos que el resto de los gránulos y contienen mieloperoxidasa, agentes antimicrobianos no oxidantes (defensinas, catepsina G y algo de lisozima) y elastasa; ii) *Gránulos específicos (secundarios)*: son más pequeños y menos densos y contienen la mayor parte de la lisozima de la célula, así como lactoferrina y fosfatasa alcalina; iii) *Gránulos terciarios*: contienen gelatinasa y iv) *Vesículas secretorias*.

Los neutrófilos son los primeros fagocitos en llegar a la zona de infección, atraídos por un mecanismo de quimiotaxis y haptotaxis debida a sustancias liberadas en el foco de la infección. Al llegar al foco infeccioso, fagocitan la partícula extraña, incluyéndola en un fagosoma, al que fusionan sus gránulos. La presencia de ciertas proteínas asociadas a los gránulos en la superficie celular permite la adhesión celular y la locomoción al sitio de infección, mientras que la presencia de estas proteínas en el fagosoma ayuda a la destrucción de los microorganismos.

Son numerosos los mecanismos por los cuales los neutrófilos llevan adelante funciones microbicidas y/o microbiostáticas. La eficiencia de la fagocitosis depende de la presencia sobre la superficie del patógeno de moléculas que puedan ser reconocidas por el neutrófilo, ya sean propias del microbio o se depositen sobre su superficie como consecuencia de la acción del sistema inmune; en este último grupo encontramos los factores C3b y C3bi y la IgG, los cuales reciben el nombre colectivo de opsoninas⁶⁵.

Cuando el neutrófilo entra en contacto con el microorganismo patógeno lo envuelve mediante pseudópodos, dando origen a una vacuola fagocítica o fagosoma. Simultáneamente, los lisosomas primarios se unen al fagosoma dando origen al fagolisosoma; dentro del mismo el microorganismo es sometido a la acción de dos sistemas citotóxicos diferentes, uno dependiente de especies oxidantes derivadas del oxígeno (oxígeno dependiente) y el otro oxígeno-independiente. Los primeros están mediados por la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) y comprenden al anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión hipoclorito (ClO^-), radical hidroxilo (OH^\cdot), oxígeno singulete ($^1O_2^-$) y cloraminas. Todos los IRO

producidos por los fagocitos derivan del anión superóxido y la enzima responsable de su generación es la NADPH oxidasa. El mecanismo microbicida oxígeno independiente esta mediado por proteasas, péptidos catiónicos y otras proteínas bactericidas. Entre las proteasas presentes en los gránulos del neutrófilo encontramos la elastasa, catepsina G, colagenasa y gelatinasa. Otras proteínas también presentes son la lactoferrina y la lisozima, esta última proteína hidroliza las uniones β 1-4 glucosídicas de los mucopéptidos de la pared bacteriana. La lactoferrina fija y retiene hierro necesario para el metabolismo bacteriano. También encontramos la proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad y los péptidos catiónicos 1 y 2 de macrófagos capaces de permeabilizar las membranas bacterianas. Las defensinas son otro grupo de péptidos moderadamente catiónicos que inducen alteraciones en la integridad de las membranas bacterianas⁶⁵. Trabajos recientes expanden el potencial de acción de los IRO y demuestran que también pueden modificar las funciones celulares al participar en la cascada de señalización (fenómeno denominado "señalización redox"). Los IRO pueden inhibir una serie de tirosín fosfatasas vía oxidación de residuos claves, permitiendo la fosforilación de moléculas⁶⁶. En otros estudios se ha encontrado que los IRO inducen la fosforilación de kinasas de adhesión focal en células endoteliales⁶⁷, esto lleva a la disrupción de las uniones intracelulares y redistribución de las adhesiones focales. Los IRO también afectan la función del neutrófilo, ya que aceleran el proceso de apoptosis dependiente de caspasa-8⁶⁸.

Finalmente, como los neutrófilos, también pueden producir y secretar un amplio abanico de citoquinas, que incluyen IL-1, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α entre otras, pueden influir en la modulación del balance entre la inmunidad humoral y celular contribuyendo a la generación de una respuesta del tipo Th1 o Th2^{69,70}.

2.3.2 Los neutrófilos en reacciones antitumorales

El rol que cumplen los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) en la progresión tumoral es controversial. En modelos animales, su presencia puede, a veces, ser perjudicial por favorecer el crecimiento maligno y la progresión tumoral⁷¹. Sin embargo, estudios más recientes han mostrado que los neutrófilos participan de forma activa en la inmunovigilancia contra algunos tumores⁷²⁻⁷⁶. Estos resultados aparentemente contradictorios podrían deberse al tipo y cantidad de citoquinas y factores quimiotácticos liberados naturalmente por las células tumorales y al grado de reclutamiento y activación de los PMNs infiltrantes del tumor.

El balance natural tumor-PMN puede ser drásticamente alterado en tumores manipulados genéticamente para liberar citoquinas o quimoquinas en su microambiente. Aunque la cantidad liberada es generalmente pequeña, ésta puede ser muy grande en comparación con las producidas por los tumores no modificados y puede producir efectos muy marcados. Casi todas las citoquinas liberadas de forma sostenida por células tumorales modificadas, a saber IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , factor estimulante para colonias de granulocitos (G-CSF) y TNF- α , generan una reacción local masiva que lleva al rechazo de éstas células tumorales productoras de citoquinas y al establecimiento de una significativa inmunidad contra las células tumorales no modificadas. Los PMNs juegan un papel fundamental en todos estos rechazos inducidos por citoquinas; frecuentemente en colaboración con linfocitos T CD8^{+77,78}. Como, los granulocitos circulantes de pacientes portadores de tumor tienen disminuida su actividad citotóxica⁷⁹, situación que empeora aún en pacientes tratados con agentes quimioterápicos⁸⁰, podrían ser propuestos sistemas capaces de llevar al reclutamiento de PMNs y a su activación dentro del microambiente tumoral como una nueva herramienta terapéutica.

La extravasación desde un vaso sanguíneo al tumor es un proceso regulado que involucra una serie de interacciones coordinadas entre los PMNs y las células endoteliales. Varias moléculas intervienen en este proceso, principalmente integrinas, selectinas y citoquinas. Las moléculas de adhesión GMP 140 (P-selectina), ELAM-1 (E-

selectina) y LAM-1 (L-selectina) permiten a los neutrófilos tomar contacto con el endotelio disminuyendo su velocidad de circulación y haciendo que “rueden” sobre el mismo. Rodando lentamente, los PMNs empiezan a recibir señales (principalmente interleuquinas y quimoquinas) liberadas por el endotelio que hacen sean reemplazadas las interacciones de baja afinidad establecidas por las selectinas por interacciones de mayor afinidad en las que participan las integrinas (sobre todo β_2 -integrina) y sus contrarreceptores en el endotelio vascular (ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1)⁶⁵.

Algunos mediadores proinflamatorios u otros factores secretados por células tumorales genéticamente modificadas incrementan la expresión en el endotelio de varias moléculas de adhesión y activación leucocitaria. IL-1 β y TNF- α inducen y/o aumentan la expresión de ELAM-1 y VCAM-1 en las células endoteliales; mientras que IFN- γ principalmente promueve la expresión de ICAM-1⁸¹. También se observó que ocurre acumulación intratumoral de PMNs cuando está presente en el microambiente IL-10, una citoquina típicamente anti-inflamatoria. Ha sido demostrado que la liberación local de altos niveles de IL-10 por células tumorales mamarias modificadas genéticamente para que liberen dicha citoquina resulta en una actividad tanto anti como pro-inflamatoria debido a una gran expresión de ELAM-1 en el endotelio en los vasos periféricos del tumor⁸².

Los PMNs reclutados al tumor por la alta expresión, por parte del endotelio, de moléculas de adhesión juegan un rol clave en la generación de una fuerte respuesta antitumoral.

Los neutrófilos reclutados producen varios mediadores citotóxicos, incluyendo especies reactivas del oxígeno (ROS), proteasas, agentes perforadores de membranas, y mediadores solubles de muerte celular, tales como TNF- α , IL-1 β e IFNs⁸³.

Ha sido demostrado que las ROS como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el ácido hipocloroso (HClO) liberados por los PMNs activados son cruciales en los efectos antitumorales de los neutrófilos^{84,85}. Otro mecanismo propuesto para la muerte de células tumorales mediada por PMNs es la citotoxicidad celular dependiente de

anticuerpos (CCDA)⁸⁶ y ha sido observado que el GM-CSF aumenta la CCDA generada por los PMNs en células tumorales de melanoma, neuroblastoma y cáncer colorectal. Como ya se mencionó con anterioridad, las defensinas son los componentes más abundantes de los gránulos azurófilos de los PMNs y también se ha visto que son moléculas muy tóxicas para ciertos tipos de células tumorales. Por otro lado, estos gránulos poseen también elastasa y catepsina G, dos proteasas particularmente perjudiciales para las células endoteliales. En concordancia con todo lo mencionado, investigaciones histológicas de las áreas tumorales muestran que el daño producido por los PMNs presenta dos formas: necrosis colicuativa cuando prevalece la citotoxicidad contra las células tumorales⁷⁷ y necrosis isquémica y/o hemorrágica cuando su principal blanco es el endotelio vascular⁸⁷.

Una molécula ya descrita capaz de inducir apoptosis en células tumorales es TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF – en inglés *TNF related apoptosis inducing ligand*); la misma, que es una proteína de membrana de tipo II perteneciente a la superfamilia de TNF, induce apoptosis selectivamente en algunas células transformadas o tumorales; mientras que las células normales suelen ser resistentes a la apoptosis mediada por TRAIL. Ha sido demostrado recientemente que los neutrófilos producen TRAIL⁸⁸ y que la capacidad de liberar esta molécula por parte de los PMNs tratados con IFNs de tipo I y II se ve amplificada por mediadores proinflamatorios, incluidos aquellos que potencialmente se encuentran presentes en el microambiente tumoral^{89,90}.

Por todo lo mencionado, se puede decir entonces que, además de ser la primera línea de defensa celular contra agentes infecciosos que entran al organismo, los neutrófilos podrían ser herramientas terapéuticas para la supresión del crecimiento y para el rechazo de, al menos, ciertos tipos de tumores.

3. APOPTOSIS Y CÁNCER

3.1 APOPTOSIS: GENERALIDADES

La apoptosis o muerte celular programada es una forma de muerte celular fisiológica regulada, en la que el núcleo sufre condensación y fragmentación, la membrana plasmática muestra gemación y vesiculación, y la célula muerta es rápidamente fagocitada sin que se libere su contenido (esto contrasta con la necrosis, en la que las membranas nuclear y plasmática se rompen y el contenido celular es liberado, siendo responsable de una reacción inflamatoria local). En muchas situaciones fisiológicas donde la muerte celular mantiene la homeostasis, ésta ocurre por apoptosis. La muerte celular programada representa un importante mecanismo homeostático en el sistema inmune; pero también, es un componente clave en la función efectora de las células T citotóxicas (LTc) y las células NK entre otras³¹.

La apoptosis de una célula puede ser inducida mediante señales extrínsecas a la misma, en cuyo caso el mecanismo ocurre por lo que se conoce como *vía extrínseca* (en esta vía intervienen moléculas como las granzimas, perforinas y ligandos de muerte producidas externamente por las células efectoras). La otra vía de inducción de apoptosis es la vía llamada *mitocondrial o intrínseca* que ocurre cuando la célula sufre daños en su ADN (debido a distintos factores como pueden ser la radiación, agentes químicos, virus, etc.), cuando la célula es privada de factores de crecimiento, o cuando es sometida a stress oxidativo.

En la presente tesis se mencionarán más detalladamente los mecanismos inductores de apoptosis en los que intervienen células efectoras, por ser los más relevantes en este trabajo.

Se conocen dos mecanismos a través de los cuales las células efectoras inducen la muerte en sus células blanco. Uno es denominado *mecanismo secretor* y el otro *mecanismo no secretor*.

3.1.1 Mecanismo secretor

Este mecanismo involucra la liberación del contenido de gránulos de las células citotóxicas activadas en forma dependiente de Ca^{+2} . Cuando se genera la sinapsis inmunitaria, las células efectoras liberan gránulos que contienen perforinas y granzimas. Las primeras forman poros en la membrana plasmática de la célula blanco facilitando la entrada de granzimas en el citosol y el núcleo⁹¹. Ha sido demostrado que los ratones *knock out* para estas proteínas son más susceptibles a adquirir infecciones y a generar tumores⁹². También se ha observado que ciertas granzimas, como la A, B y H, no necesitan la presencia de perforinas para entrar a la célula; pero pierden la capacidad de inducir apoptosis, aunque esta capacidad se ve recuperada si, luego de la internalización de granzima B (GraB), se agregan perforinas al cultivo. Este resultado indicaría que las perforinas son necesarias para la liberación de las granzimas de sus compartimentos endosómicos dentro de la célula blanco⁹³. Luego, fue descubierto un receptor específico para GraB y surgió una hipótesis según la cual esta enzima sería endocitada específicamente al hacer contacto con su receptor en la membrana; luego las perforinas secretadas por la célula efectora liberarían las granzimas secuestradas en los endosomas de la célula blanco e inducirían así la apoptosis⁵¹.

La GraB es un miembro de la familia de las caspasas. Los miembros de esta familia son cruciales en la inducción de apoptosis, y para ello requieren su previa activación a través del clivaje de residuos internos de ácido aspártico. En la célula blanco, la GraB inicia la cascada proteolítica activando las caspasas-3 y 8 requeridas para la muerte celular.

La GraB, también es capaz de activar la apoptosis por una vía independiente de caspasas, a través de la mitocondria. Esta enzima, activa una proteína citosólica denominada BID, la cual induce cambios en el potencial de membrana de la mitocondria y la activación de genes pro-apoptóticos como Bax y Bak. Este cambio de potencial genera la liberación de productos, como el citocromo c. Éste, una vez en el citosol, activa un complejo proteico llamado apoptosoma, que activa directamente a la procaspasa-9. Una vez que la caspasa-9 está activada, ésta activa a su vez a las caspasas

efectoras como la caspasa-3, lo que lleva a la apoptosis de la célula agredida. Durante la inducción de la apoptosis ocurre también la fragmentación del ADN (**Figura 6**).

Los linfocitos no son susceptibles a las granzimas y perforinas que ellos mismos liberan porque expresan un inhibidor de proteasas llamado PI-9 que los protege de la acción de GraB.

3.1.2 Mecanismo no secretor

En experimentos utilizando ratones con alteraciones en la vía de perforinas y granzimas, se observó que los linfocitos T de estos animales conservan su capacidad citotóxica. Esto puso en evidencia la existencia de otro mecanismo dependiente del contacto celular capaz de inducir apoptosis. Este mecanismo involucra la interacción de ligandos en la superficie de los linfocitos con su correspondiente receptor en la célula blanco.

Los ligandos de muerte descritos capaces de interaccionar con sus receptores y generar señales intracelulares de apoptosis son: TNF- α , Fas ligando (FasL) y TRAIL. Estos ligandos inducen la trimerización de sus receptores (TNF-RI, TNF-RII y Fas/CD95), lo cual da lugar al reclutamiento de moléculas transductoras de señales de muerte. Estos receptores están caracterizados por una región estructuralmente homóloga en su dominio intracelular llamada “dominio de muerte” (DD). Al interaccionar con sus ligandos se produce la agregación de los receptores, los cuales, entonces, se unen a proteínas adaptadoras (como son FADD y TRADD). A continuación, estas proteínas activan una cascada de caspasas, que, a través de su interacción con el “dominio efector de muerte” (DED) inducen apoptosis en la célula blanco. Se llama complejo de señales inductoras de muerte (DISC) al conjunto de TNF-R, las proteínas adaptadoras y la caspasa-8.

La interacción de FasL con Fas induce el reclutamiento y la activación de la caspasa-8 a través de la interacción de la proteína adaptadora FADD. La activación de la caspasa-8 tiene distintos efectos según el tipo celular; en determinadas células, resulta en la activación directa de otras caspasas como la caspasa-3; mientras que en otras produce la

activación de BID y su posterior traslocación a mitocondria junto con Bax. En la mitocondria, estas moléculas inducen la liberación de citocromo c que activa la procaspasa-9 a través de su interacción con la proteína apoptótica adaptadora APAF-1. La caspasa-9 cliva entonces a la procaspasa-3, que finalmente activa endonucleasas que completan el proceso degradando el ADN (**Figura 6**)⁵¹.

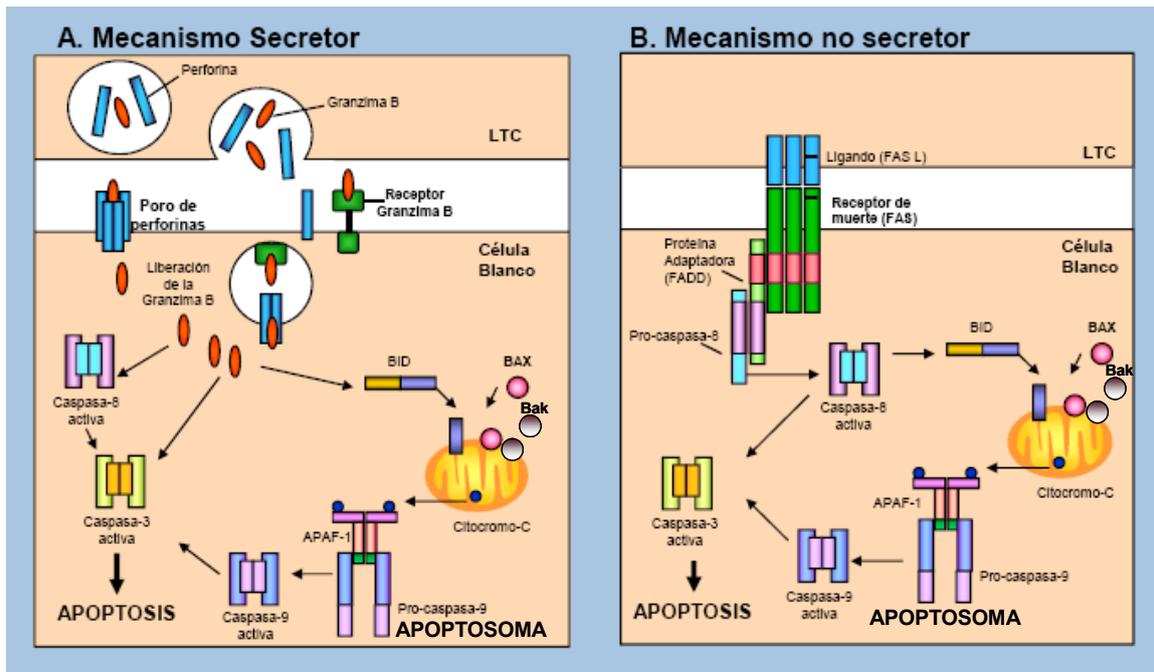


Figura 6. Mecanismos de inducción de apoptosis por una célula efectora. Se ilustran el mecanismo secretor (**A**) mediado por perforinas y granzimas y el mecanismo no secretor (**B**) ejemplificado con el sistema Fas/FasL. (Adaptado de *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina*⁵¹).

3.2 EVASIÓN DE LA APOPTOSIS EN PROCESOS TUMORALES

3.2.1 Mecanismos de evasión basados en la resistencia a la apoptosis

Como ya se mencionó con anterioridad en esta tesis, las células malignas presentan una elevada resistencia a la inducción de apoptosis. Las células tumorales son, por lo tanto, capaces de evadir los mecanismos homeostáticos de control y pueden sobrevivir en tejidos que no son los que les dieron origen.

Por otro lado, las interacciones entre el sistema inmune y las células malignas cumplen una función muy importante en el desarrollo tumoral. Si el sistema inmune falla en la detección o en la destrucción de células transformadas, éstas pueden proliferar hasta la generación de un tumor maligno. Como ya se mencionó en el anterior capítulo de la presente tesis, los tumores pueden utilizar múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmune antitumoral.

Las células tumorales son capaces de desarrollar muchas estrategias para bloquear los mecanismos de muerte inducidos por células efectoras del sistema inmune. Dentro de estas estrategias cabe destacar las siguientes:

➤ **Incremento de la expresión de proteínas anti-apoptóticas**

Esta es una estrategia descrita en muchas líneas celulares provenientes de tumores tanto humanos como murinos.

Ha sido descrito que la activación de los receptores para TRAIL activa a su vez al factor de transcripción NF- κ B en muchas células malignas. La activación parece ser dependiente de la interacción de TRADD con otras dos proteínas llamadas RIP y TRAF2. Este complejo activa quinasas que fosforilan a I κ B lo que lleva a la degradación del mismo, esto permite que NF- κ B sea liberado y pueda entrar al núcleo, donde se une a regiones promotoras de un gran número de genes que codifican para proteínas capaces de inhibir la apoptosis, como la familia de inhibidores de apoptosis (IAP1, IAP2 y XIAP), la familia de Bcl-2 (Bcl-X_L y BFL-1) y la proteína citoplasmática A20 que es capaz de inhibir las vías de señalización de apoptosis⁹⁴. Ha sido observado que células de leucemia se vuelven sensibles a la apoptosis inducida por TNF- α , FasL o TRAIL cuando la activación de NF- κ B es bloqueada por inhibidores del proteosoma o por transfección de una variante de I κ B resistente a la degradación que no libera a NF- κ B. La inhibición de la activación de NF- κ B también sensibiliza células de melanoma a la apoptosis mediada por TRAIL⁹⁴.

También ha sido descrito el aumento de expresión de FLIPs (proteínas inhibitorias de FLICE o procaspasa-8) en células tumorales. Las proteínas FLIPs son capaces de bloquear la interacción entre la procaspasa-8 y el FADD, impidiendo su activación. Son estructuralmente homólogas a la procaspasa-8 pero carecen del dominio catalítico. Tienen la capacidad de unirse al DISC inhibiendo el procesamiento y la activación de la caspasa iniciadora⁹⁵.

Como ya se mencionó las células tumorales poseen mecanismos capaces de bloquear la apoptosis inducida a través de receptores de muerte; sin embargo, también ha sido demostrado que pueden resistir la apoptosis inducida por LTc por inhibición de la vía que involucra a perforinas y granzimas. Este mecanismo de escape involucra la expresión del inhibidor de proteasas PI-9, que es capaz de inactivar a la molécula efectora de apoptosis granzima B. La expresión de PI-9 fue observada en una gran variedad de tumores humanos y murinos. Es por esto que, la proteína PI-9, ha sido propuesta como un importante parámetro para determinar el éxito de las inmunoterapias basadas en la utilización de células T⁹⁶.

➤ **Disminución de la expresión de proteínas pro-apoptóticas**

El caso más citado es el de la proteína p53. Esta proteína participa activamente regulando la progresión de la célula a través del ciclo celular e induce el arresto del ciclo en la fase G0 como respuesta a daño en el ADN. Si el ADN dañado no puede ser reparado, p53 es capaz de inducir apoptosis en la célula. Luego de la activación de p53, la membrana mitocondrial es permeabilizada y permite la liberación de citocromo c, éste promueve la formación del apoptosoma que, como ya se mencionó, lleva a la activación de la caspasa-3 lo que da lugar a la ejecución de la muerte celular programada. Este proceso puede ser inactivado por proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2, a través de la inhibición de la liberación del citocromo c mitocondrial, bloqueando los canales iónicos dependientes de voltaje.

Las células que poseen defectos en la expresión o actividad de p53 son incapaces de generar una respuesta apoptótica.

➤ **Disminución de la expresión de receptores de muerte o expresión de receptores “señuelo”**

Otra estrategia llevada a cabo por muchas células tumorales es la de disminuir la expresión de receptores de muerte en sus membranas⁵¹. Por otro lado, en muchas líneas celulares de origen tumoral se ha observado la sobreexpresión de receptores “señuelo” para Fas ligando. Éstos son receptores de membrana capaces de unir a Fas ligando pero que carecen de los dominios de señalización intracelulares con lo que no generan la inducción de apoptosis⁹⁷.

3.2.2 Mecanismos de evasión basados en la modulación de linfocitos T

En trabajos más recientes ha sido demostrado que las células tumorales no solo resisten la destrucción mediada por el sistema inmune en forma pasiva, sino que son capaces de matar activamente a linfocitos para suprimir la respuesta inmune antitumoral en un proceso conocido como “contraataque”⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Se ha descrito que la molécula Fas ligando expresada en la superficie de diversos tipos de tumores y también secretada al microambiente tumoral posee propiedades inmunosupresoras promoviendo la apoptosis de células T activadas⁹⁹. En un modelo experimental de melanoma murino, se observó que la expresión de FasL está regulada en forma autócrina por IL-18 favoreciendo el escape de este tumor del reconocimiento inmunológico¹⁰¹; también se ha visto que en células de carcinomas humanos de cabeza y cuello, la expresión de FasL promueve la apoptosis de linfocitos T *in vitro*¹⁰².

Sin embargo, la participación de este mediador aún es tema de debate; ya que por un lado la evidencia preliminar parece demostrar que el contraataque tumoral existe realmente en tumores humanos y se vio que la expresión de FasL puede prevenir la respuesta celular T *in vitro*; pero por otro lado se ha observado que tumores que expresan FasL son rápidamente rechazados e inducen inflamación en modelos murinos¹⁰³.

Más recientemente ha sido descrito que Galectina-1, una molécula perteneciente a una familia de proteínas que poseen afinidad por azúcares β -galactósidos, cumple un rol esencial en el escape de células tumorales debido a su capacidad de inducción de apoptosis de linfocitos T¹⁰⁰.

4. INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASAS LEUCOCITARIAS (SLPI)

4.1 GENERALIDADES

El Inhibidor Secretorio de Proteasas Leucocitarias (SLPI) humano fue aislado originalmente de secreciones bronquiales y posteriormente fue caracterizado por dos grupos de forma independiente en el año 1986^{104,105}. SLPI es una proteína básica (pI \approx 9,5) no glicosilada de 107 aminoácidos. Su peso molecular es de 11,7 kDa y posee gran afinidad por las serino proteasas neutrofilicas como la elastasa y la catepsina G¹⁰⁶.

El SLPI está formado por dos dominios, cada uno de los cuales contiene ocho residuos de cisteína que forman 4 puentes disulfuro que estabilizan la estructura de la molécula¹⁰⁷ (**Figuras 7 y 8**). Estos dominios ricos en cisteína son también llamados dominios WAP porque fueron hallados inicialmente en la proteína ácida del suero (del inglés *whey acidic protein*), la cual se encuentra en altas concentraciones en la leche de los roedores. A pesar de que SLPI es la molécula mejor caracterizada de su grupo, han sido identificados 14 genes que codifican para proteínas de tipo WAP en el mismo locus del cromosoma humano (20q12-13.2). Sin embargo las secuencias no están bien conservadas excepto por los residuos de cisteína. En particular, el gen del SLPI humano consiste de cuatro exones y tres intrones¹⁰⁸.

El SLPI se halla presente en forma constitutiva en la mayoría de los fluidos extravasculares que limitan mucosas, ya que es secretado por diversos tipos celulares. En el pulmón se produce *in vivo* por las glándulas serosas de la tráquea y por las células Clara bronquiales. En el tracto genital masculino y femenino se encuentra en el plasma seminal y en la mucosa cervical respectivamente. Además, es producido por glándulas parótidas, por células del epitelio intestinal, por células del túbulo renal, por queratinocitos, por las células beta del páncreas, por neutrófilos y por macrófagos¹⁰⁹⁻¹¹⁷. La expresión del SLPI se encuentra significativamente aumentada por la progesterona¹¹⁸ y por las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β ¹¹⁹.

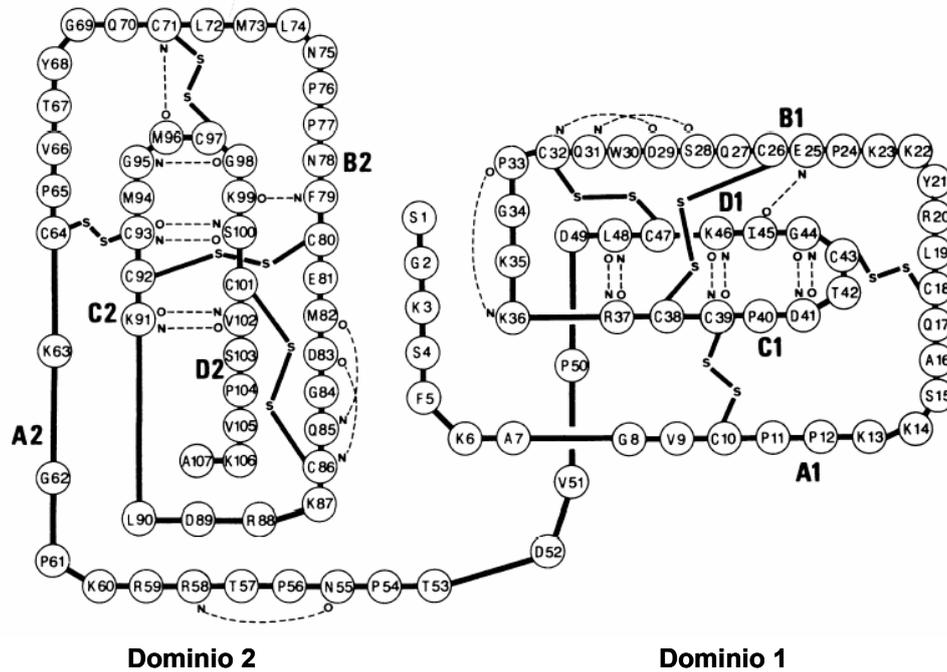


Figura 7. Representación esquemática del SLPI humano y sus puentes disulfuro. Los principales puentes de hidrógeno intercatenarios se muestran con líneas punteadas (Adaptado de *The EMBO Journal*¹⁰⁷).

La concentración fisiológica del SLPI en saliva es de 0,35 – 2 μM , mientras que en los pulmones su concentración es más elevada en las vías aéreas superiores que en los compartimentos alveolares. Fue observado que la concentración de SLPI en individuos normales, no fumadores es de aproximadamente 8,7 μM en las vías aéreas superiores y de 0,6 μM en el tracto respiratorio inferior¹²⁰. Sin embargo, pacientes con enfisema pulmonar mostraron niveles significativamente inferiores de SLPI que los observados en los pacientes sanos¹²¹.

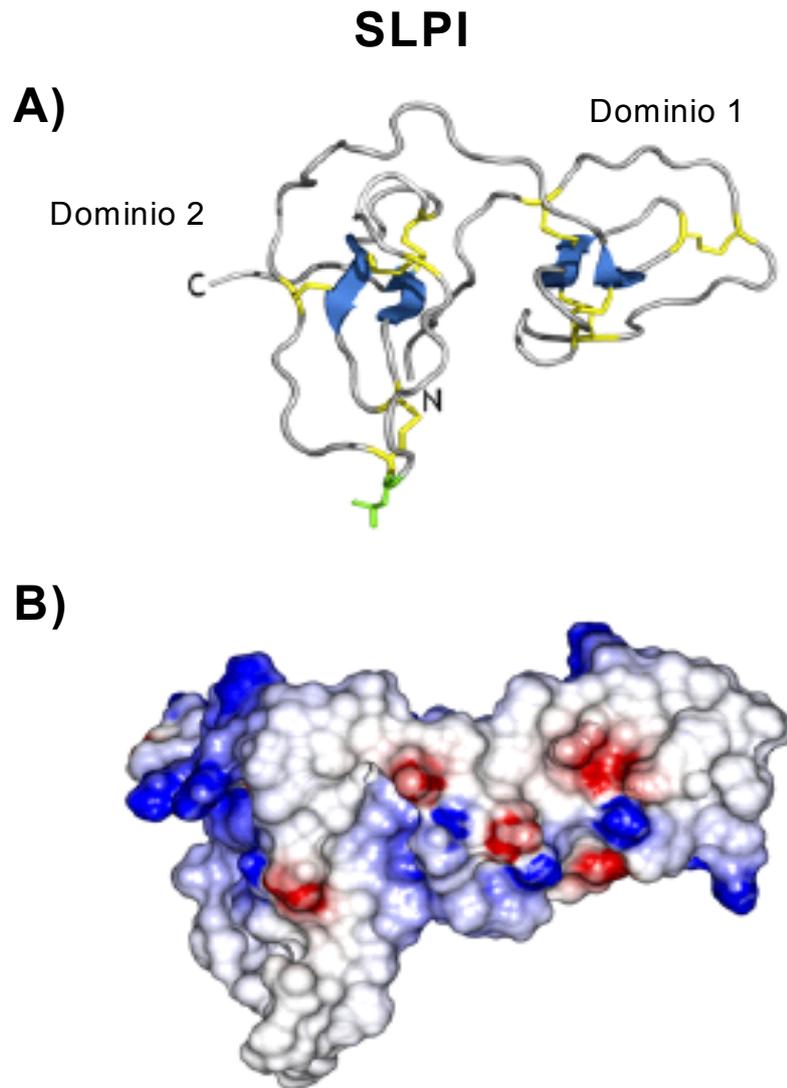


Figura 8. Estructura tridimensional del SLPI humano. (A) Diagrama de cintas de la estructura tridimensional del SLPI. En verde se muestra el sitio inhibitorio. Los puentes disulfuro de cada dominio WAP están coloreados en amarillo. **(B)** Superficie molecular del SLPI en la misma orientación que en **(A)** coloreado según el potencial electrostático de superficie (azul, regiones positivas; rojo, regiones negativas. Adaptado de *Biochimie*¹⁰⁶).

4.2 FUNCIONES DEL SLPI

4.2.1 Propiedades inhibitorias

SLPI inhibe una gran variedad de proteasas incluyendo la elastasa neutrofílica y la catepsina G, la tripsina, la quimiotripsina y la quimasa. Como el SLPI posee dos

dominios en su estructura, inicialmente se postuló que en ambos se encontraría un sitio inhibitorio de proteasas¹⁰⁴. Estudios posteriores de las propiedades inhibitorias de cada dominio usando modificaciones químicas o mutaciones de residuos críticos, mostraron que la unión 1:1 con la proteasa ocurre a través del dominio 2 y es clave en este proceso la leucina 72 (Leu72); mientras que el dominio 1 probablemente no tiene actividad inhibitoria¹²². Ha sido propuesto que el dominio 1 ayudaría a estabilizar el complejo SLPI - elastasa¹²³.

La gran afinidad del SLPI por las serino proteasas neutrofílicas y su alta concentración local en el compartimiento bronquial (cerca de 5 μ M) sugiere que su principal función fisiológica es regular cualquier actividad excesiva de las serino proteasas neutrofílicas en las vías aéreas superiores. Se cree que el SLPI es un colaborador menor de la inhibición de elastasa en los alvéolos porque α 1-PI, una serpina que preferentemente inhibe elastasa neutrofílica *in vivo*, alcanza una concentración tres a diez veces mayor que la del SLPI en los alvéolos. También el SLPI está asociado con fibras de elastina en la matriz extracelular del pulmón y en la piel lo que sugiere que previene la proteólisis de elastina. Además de su rol en los pulmones, se cree que el SLPI, está involucrado en el control de la proteólisis inducida por proteasas neutrofílicas en los sitios de inflamación, como en las superficies de las mucosas, donde es producido¹⁰⁶.

Proteasas de agentes patógenos pueden clivar al SLPI alterando de esta forma sus propiedades inhibitorias. Esto ha sido demostrado para proteasas de *Trichomonas vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Porphyromonas gingivalis*. La oxidación de la Met73 puede también disminuir la capacidad inhibitoria del SLPI. Esto puede ser relevante en enfermedades pulmonares crónicas tales como la fibrosis quística, la neumonía o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), las cuales se caracterizan por una excesiva carga de proteasas de origen endógeno o bacteriano y un aumento del stress oxidativo¹⁰⁶.

4.2.2 Actividad anti-HIV-1

La investigación de la selectiva actividad inhibitoria anti-HIV-1 de la saliva humana llevó a la identificación del SLPI como el factor responsable de esta actividad¹²⁴. Como el SLPI resultaba activo a concentraciones fisiológicas fue sugerido que el mismo sería responsable de la baja proporción de transmisión oral del HIV-1. Aunque el mecanismo por el cual el SLPI inhibe la infección por el HIV-1 no ha sido del todo elucidado, parece ser que la actividad antiviral del SLPI es independiente de sus propiedades anti-proteasas y no resulta de una interacción directa con el virus; sino más bien de interacciones con las células huésped¹²⁵. En un estudio más reciente fue demostrado que el SLPI se une a la proteína de unión a fosfolípidos, anexina II en la membrana de macrófagos humanos. Esta molécula es un cofactor celular que interviene en la infección de los macrófagos por HIV-1; por lo tanto el SLPI sería capaz de impedir la unión del virus a la superficie del macrófago y por lo tanto evitaría la infección¹²⁶. Concentraciones elevadas de SLPI en fluidos vaginales parecen estar asociadas con las reducidas proporciones de transmisión perinatal de HIV-1 y podrían contribuir con las defensas anti-retrovirales naturales¹²⁷.

4.2.3 Actividad anti-bacteriana y anti-fúngica

Numerosos estudios adjudican al SLPI un rol a nivel de las mucosas; en particular una actividad anti-microbiana de amplio espectro¹²⁸. Se ha descrito que el SLPI actúa inhibiendo la acción de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, entre las cuales podemos citar a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*¹²⁹. La actividad bactericida del SLPI contra *S. aureus* y *E. coli* ha sido atribuida a su dominio N-terminal (no inhibitorio); sin embargo, los dos dominios aislados solos o combinados son significativamente menos activos que el SLPI nativo.

También se ha observado que la expresión y secreción de SLPI es inducida en queratinocitos humanos y en células epiteliales bronquiales después de la exposición a *Pseudomonas aeruginosa*. Como el SLPI es también expresado en el endometrio, esto

refuerza el concepto emergente de que esta proteína es importante como molécula de defensa en las secreciones de las mucosas junto a las familias de péptidos anti-microbianos de las defensinas y las catelicidinas. Interesantemente, muchas proteínas que contienen motivos WAP pero que no son inhibidoras de proteasas también poseen actividad anti-bacteriana.

Por otro lado, además de su actividad anti-bacteriana, el SLPI posee una bien caracterizada actividad anti-fúngica. Ha sido descrito que el SLPI actúa contra *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* aislados de pacientes, y su acción, como su actividad anti-bacteriana, ha sido adjudicada al dominio N-terminal del SLPI¹³⁰. La actividad fungicida del SLPI resultó ser comparable a la observada con las defensinas humanas y con la lisozima.

El mecanismo bioquímico responsable de las actividades tanto anti-bacteriana como anti-fúngica de las proteínas con motivos WAP aún es tema de debate; pero, por comparación con otros péptidos anti-microbianos, se sugiere que las mismas se deben a la naturaleza catiónica de muchas de éstas proteínas (SLPI posee una carga neta de +12) lo que les permitiría desestabilizar las membranas celulares cargadas negativamente.

4.2.4 Actividad anti-inflamatoria

Muchos estudios han mostrado que el SLPI es una molécula con actividad anti-inflamatoria en desórdenes tales como arterioesclerosis, infarto de miocardio y enfisema pulmonar y que esta característica es, aparentemente, independiente de su actividad anti-proteasa¹³¹. El SLPI previene la activación de NF- κ B, un factor de transcripción que aumenta la síntesis de muchos mediadores pro-inflamatorios. La supresión de la activación de NF- κ B está asociada al incremento de la síntesis de I κ B β (factor inhibitorio de NF- κ B). Experimentos en los cuales SLPI fue incubado con monocitos de sangre periférica o con la línea monocítica U937 demostraron que SLPI es rápidamente captado por las células y se localiza en citoplasma y núcleo¹³². En el citoplasma, SLPI previene la degradación de varias proteínas reguladoras de la activación de NF- κ B, incluyendo I κ B α , I κ B β e IRAK (quinasa asociada al receptor de IL-1). La inhibición de

la degradación de las proteínas I κ B no permite su liberación del complejo que forman con NF- κ B, impidiendo de esta forma la entrada de NF- κ B al núcleo y la consecuente activación de la transcripción de genes pro-inflamatorios.

En el núcleo, SLPI también interfiere con NF- κ B compitiendo por el sitio de unión de a la región promotora de genes pro-inflamatorios como IL-8 y TNF- α , inhibiendo así su transcripción¹³². Aunque aún no es del todo claro si la actividad anti-inflamatoria del SLPI es dependiente o no de su actividad anti-proteasa, varias mutantes y variantes de SLPI oxidado, que se sabe tienen disminuida su potencia inhibitoria, no pudieron prevenir la degradación de I κ B α e I κ B β ¹³³.

El SLPI, además de interferir en la vía de señalización de NF- κ B, está también involucrado en la respuesta a las señales de inflamación temprana. También ha sido descrito que el SLPI se une a LPS. La consecuencia biológica de la interacción SLPI-LPS es que SLPI inhibe la respuesta del macrófago frente al LPS, en parte por bloqueo de la transferencia de LPS al CD14 soluble¹³⁴.

4.2.5 Reparación tisular y proliferación celular

Se ha descrito al SLPI como una molécula con capacidad para promover la cicatrización de heridas¹³⁵. En modelos utilizando ratones *knock out* para SLPI se observó un retraso de la cicatrización de heridas cutáneas, atribuido a la acrecentada y prolongada respuesta inflamatoria y al retraso en la deposición de proteínas de la matriz. Tres serían las funciones principales del SLPI como promotor de la cicatrización de heridas; la primera sería la actividad inhibitoria sobre la elastasa local, ya que esto previene la degradación de algunas de las proteínas de la matriz tales como el colágeno, proteoglicanos y fibronectina. La segunda es el control de actividad de los leucocitos, lo que estaría relacionado con la disminución de la actividad de TGF- β considerada como la tercera función del SLPI¹³⁶.

Por otro lado, estudios *in vitro* sugieren que los inhibidores de serino proteasas también afectarían al crecimiento celular. En particular, el SLPI estimularía la producción de

factores de crecimiento en fibroblastos humanos pulmonares¹³⁷. Asimismo, en las células epiteliales del endometrio el SLPI ejercería una regulación positiva y negativa sobre genes asociados al crecimiento; tales como ciclina D1 y TGF- β respectivamente¹³⁸.

4.3 SLPI Y CÁNCER

Es bien conocido que las proteasas cumplen un papel importante en la progresión y malignidad de diversos tumores. La progresión tumoral está generalmente asociada al remodelamiento del tejido para proveer de un ambiente adecuado para el crecimiento del tumor, la angiogénesis, la invasión y la metástasis de las células¹³⁹. Dado la capacidad de las proteasas para liberar citoquinas y factores de crecimiento y por su facilidad para degradar componentes de la matriz extracelular, estas moléculas son necesarias para generar condiciones óptimas para el crecimiento y la invasión de las células tumorales.

La expresión de inhibidores de proteasas es un camino para el control de la actividad de estas enzimas. En este contexto, la expresión de inhibidores se ha considerado generalmente como responsables de una acción antitumoral¹⁴⁰. Uno de los mejores ejemplos es la maspina, una serpina que inicialmente se identificó en epitelio mamario y demostró tener una clara actividad antitumoral¹⁴¹. Además ciertos inhibidores de proteasas han demostrado tener actividad inhibitoria de la invasividad y metástasis de células tumorales en modelos experimentales¹⁴² e incluso algunos inhibidores sintéticos de bajo peso molecular se han utilizado en terapia contra cierto tipo de tumores¹⁴³. También ha sido descrito que un inhibidor sintético de la elastasa (ONO-5046.Na) administrado de forma intraperitoneal diariamente en ratones fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral y las metástasis generadas a partir de una línea de cáncer de pulmón (EBC-1) inoculada de forma subcutánea (s.c)¹⁴⁴.

Sin embargo, un número creciente de estudios, han revelado que algunos inhibidores de serino proteasas se sobreexpresan en células tumorales de pacientes con cáncer que

tienen un peor pronóstico¹⁴⁵⁻¹⁴⁷, sugiriendo que esta sobreexpresión de los inhibidores puede llegar a favorecer la progresión del tumor. Es más, ha sido demostrado que la sobreexpresión de algunos inhibidores de serino proteasas provocan un aumento de la malignidad de algunas células tumorales¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

Muchos estudios han mostrado que la expresión del SLPI está modulada en cáncer. Sin embargo, se ha observado aumento o disminución de la expresión de esta proteína dependiendo del tipo de tumor. Por ejemplo, la expresión de SLPI está aumentada en el cáncer de páncreas¹⁵¹, tiroides¹⁵², cuello uterino¹⁵³, endometrio¹³⁸ y de ovario¹⁵⁴. Por el contrario, se expresa débilmente en carcinoma nasofaríngeo¹⁵⁵, tumores de vejiga¹⁵⁶ y algunos carcinomas mamarios¹⁵⁷; sin embargo, en estos últimos tiempos se ha podido observar que el aumento de expresión de esta proteína, se correlaciona con formas más invasivas de carcinoma mamario¹⁵⁸ (**Tabla 1**).

Además, la sobreexpresión de SLPI fue asociada con tumores metastásicos, agresivos y de alto riesgo^{138,158,159}. Por ejemplo, aunque el SLPI no está expresado en todos los tipos de tumores pulmonares, su expresión está significativamente aumentada en el cáncer pulmonar de células no pequeñas y se observó que las concentraciones séricas de SLPI son más elevadas en pacientes en estadios III y IV que en los que se encontraban en estadios I y II. Además estas concentraciones disminuyeron durante el período estable post-tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas cuyo tratamiento, quirúrgico o quimioterapéutico, había resultado efectivo¹⁶⁰.

Aunque ha sido reportado que no existen diferencias significativas en concentraciones plasmáticas de SLPI entre pacientes con metástasis y aquellos con tumores pulmonares locales¹⁶¹, cierta evidencia experimental sugiere un rol directo del SLPI en el potencial tumorigénico, metastásico o en ambos¹⁶². Ha sido observado en ratones inmunodeficientes inoculados de forma s.c. con la línea celular de Lewis (células 3LL-S) transfectadas previamente con el gen del SLPI tanto murino como humano que, la sobreexpresión del SLPI promueve la tumorigénesis y que, en este evento, es esencial la actividad anti-leucoproteasa de esta proteína¹⁶².

Algunos estudios han demostrado una asociación entre la expresión de SLPI y la invasividad de tumores mamarios. En un modelo murino utilizando la línea celular inmortalizada HC11 (originada a partir de células epiteliales mamarias), se observó que aquellas que expresaban el receptor para el factor estimulante de colonias macrofágicas (CSF1R) mostraron invasión local *in vitro* y tumorigénesis aumentada *in vivo*. Por otro lado, ratones inoculados con estas mismas células transfectadas con el gen para el CSF1R mutado perdieron su capacidad metastásica e invasiva. La expresión de SLPI en este modelo resultó ser más elevada en las células que tenían el CSF1R sin mutaciones; es decir en las de mayor capacidad invasiva/metastásica¹⁵⁸.

En cáncer de ovario, la sobreexpresión de SLPI tiene una asociación particular con la progresión tumoral y su nivel en suero ha sido propuesto como marcador específico para diagnóstico de esta patología¹⁶³. El SLPI está aumentado en todos los tipos de cáncer de ovario estudiados y su concentración plasmática se encuentra significativamente aumentada en éstos pacientes al compararlos con aquellos que presentan quistes benignos¹⁶³. También se ha observado que en el tracto reproductor femenino, las citoquinas inflamatorias y las hormonas esteroides (dos factores que cumplen un rol importante en el desarrollo del cáncer de ovario) inducen la expresión de SLPI¹⁵⁹.

La expresión de SLPI ha sido asociada también con la progresión tumoral en estudios realizados sobre líneas celulares tumorales de endometrio. El silenciamiento de la expresión de SLPI con ARN antisentido mostró que esta proteína aumenta la expresión del gen de ciclina D1, y disminuye la expresión de factores anti-proliferativos y pro-apoptóticos¹³⁸.

La función fisiopatológica del SLPI producido por los tumores también ha sido tema de debate. Como ya se mencionó, algunos autores sostienen que las anti-leucoproteasas podrían evitar la progresión tumoral al inhibir las proteasas liberadas por los tumores; mientras que otros apoyan un efecto pro-tumoral del SLPI basados en los estudios recientemente enumerados que correlacionan los niveles de expresión de esta proteína con la agresividad del tumor. Ha sido postulado también que la ausencia de la función

anti-proteasa del SLPI podría promover la diseminación del tumor por permitir la degradación del tejido circundante por parte de las proteasas secretadas por las células malignas. Sin embargo, otros numerosos estudios han demostrado una asociación negativa entre la expresión de SLPI y la progresión tumoral.

	Medición	Aumenta	Disminuye	No regulado
Tiroides	ARNm	X ¹⁵²		X ¹⁵⁹
Intestino	ARNm	X ¹⁵⁹		
Linfoma	ARNm		X ¹⁶⁴	
Páncreas	ARNm	X ¹⁵¹		X ¹⁵⁹
Pulmón	Proteína	X ¹⁶⁰		
Mama	ARNm	X ¹⁶⁵	X ¹⁵⁷	X ¹⁵⁹
Ovario	ARNm	X ^{154,159}		
	Proteína	X ¹⁶³		
Endometrio	ARNm	X ¹³⁸		
Útero	ARNm	X ¹⁵⁹		
	Proteína		X ¹⁶⁶	
Nasofaringe	ARNm		X ¹⁵⁵	
Vejiga	ARNm		X ¹⁵⁶	
Riñón	ARNm			X ¹⁵⁹
Estómago	ARNm			X ¹⁵⁹
Cuello Útero	ARNm	X ¹⁵⁹		

Tabla 1. Expresión de SLPI en tumores humanos. Se muestra en la tabla un resumen de los datos informados en bibliografía sobre expresión de SLPI en tumores humanos de distinto origen. En la misma se detalla sobre que moléculas fueron realizadas las medidas (ARNm o proteína) y las referencias bibliográficas de los diferentes trabajos.

Por ejemplo, se ha observado que el SLPI está disminuido en células de linfomas agresivos al compararse con células relacionadas pero de tipo no-agresivos¹⁶⁴. También ha sido descrita una reducida expresión de SLPI en algunos adenocarcinomas cervicales; lo que sugiere una función anti-tumorigénica de esta proteína, al menos en ciertos tipos de tejidos¹⁶⁶. Además, tumores mamarios murinos desarrollados a partir de

una línea celular mutante que no expresa p53 mostraron una disminución en la expresión de SLPI¹⁵⁷. Debido a que el SLPI inhibe la activación inducida por LPS de la vía de NF- κ B¹⁶⁷, fue propuesto que la expresión de esta proteína podría prevenir el carcinoma mamario por inhibición de la vía de NF- κ B.

En un trabajo más reciente, para establecer la relación existente entre la expresión de SLPI y las metástasis hepáticas, fueron generados clones de la sublínea altamente metastásica H-59 (derivada a su vez de la línea 3LL-S) que sobreexpresaban SLPI. Fue demostrado con este modelo que la habilidad de esas células (sobrepadoras de SLPI) de producir una respuesta pro-inflamatoria en el hígado fue marcadamente disminuida, y estas células formaron significativamente menos metástasis hepáticas (hasta un 80 % menos) que las células control. De esta forma fue demostrado que el SLPI es capaz de disminuir el potencial metastásico de las células tumorales y este efecto protector se correlacionó con una disminución en la producción de TNF- α hepático y selectina-E¹⁶⁸.

Sin embargo, recientemente, otros autores demostraron que el SLPI promueve la formación de metástasis por una vía independiente de invasión denominada en inglés *blood-borne metastasis*¹⁶⁹. Ésta fue descrita por primera vez en un modelo murino en el año 2002¹⁷⁰ y establece que grupos de células tumorales son capaces de generar un proceso de *intravasación* (es decir, penetrar en un vaso sanguíneo) pero rodeadas por células endoteliales. Una vez en la circulación, el grupo de células tumorales rodeadas de las células endoteliales podría ser mecánicamente arrestado en una arteriola y entonces proliferar *intravascularmente*. Es importante destacar, que durante este proceso, las células tumorales no atravesarían en ningún momento la pared vascular. Estos autores transfectaron el gen del SLPI en un clon débilmente metastásico de la línea celular tumoral murina de origen mamario MCH66. Aunque las células transfectadas con el SLPI mostraron menor capacidad invasiva *in vitro*, la inoculación *in vivo* de estas células resultó en la formación de numerosos focos metastásicos en pulmones y ganglios linfáticos. El examen histológico reveló que los tumores transfectados con SLPI formaron una vasculatura sinusoidal CD31-positiva. Además, estos tumores crecieron de forma intravascular y formaron focos metastásicos en

pulmón. Basados en estos resultados los autores propusieron un rol funcional del SLPI en la metástasis invasión-independiente¹⁶⁹.

Finalmente, en un estudio reciente, líneas celulares tumorales de cáncer de ovario humanas fueron transfectadas de forma transiente con el gen del SLPI. Éstas mostraron una menor capacidad invasiva e inhibición del crecimiento celular *in vitro*. Por otro lado, se observó un aumento en la expresión de TRAIL, TNF- α y sus correspondientes receptores de muerte en las células que expresaban SLPI a la vez que una activación significativa de las caspasas-2, -8 y -9. Además se vio que una gran proporción de estas células se encontraban arrestadas en G1 y muchas fueron halladas apoptóticas. Por todos estos resultados, estos autores llegaron a proponer al SLPI como una posible herramienta terapéutica para el tratamiento del cáncer de ovario¹⁷¹.

Sin embargo, en ninguno de estos interesantes trabajos, se estudió la interacción entre las células tumorales que sobreexpresan el SLPI y el sistema inmune del huésped, algo muy importante a tener en cuenta en la progresión tumoral según la teoría de inmunedición del cáncer que se mencionó con anterioridad.

Como puede deducirse de todo lo mencionado, actualmente existe controversia entre los investigadores sobre el posible rol que el SLPI cumpliría en los procesos tumorales. Todos estos estudios, avalan una acción del SLPI en la progresión tumoral; pero, sin embargo, no permiten sacar una conclusión cierta sobre la actividad pro o antitumoral del mismo, tal vez debido a la omisión del estudio de la función que cumple la respuesta inmune del huésped durante el desarrollo de los tumores productores de SLPI.

El objetivo general de esta tesis de doctorado fue esclarecer la función del SLPI en cáncer y los mecanismos de acción de dicha proteína utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo*; en particular se analizó:

1. La acción del SLPI sobre moléculas de superficie en células epiteliales y del sistema inmune.
2. El crecimiento tumoral generado a partir de células malignas productoras o no de SLPI en modelos murinos.
3. La participación del sistema inmune en la respuesta generada por el huésped frente a la inoculación de células tumorales productoras de SLPI.
4. La presencia de factores pro-apoptóticos en el plasma de ratones que rechazan las células tumorales hiperproductoras de SLPI.
5. El efecto de la administración exógena de SLPI recombinante humano (SLPIrh) en modelos tumorales murinos.

Líneas celulares tumorales y condiciones de cultivo

La línea celular HeLa fue establecida a partir de un carcinoma humano de cuello uterino y ha sido descrita con anterioridad¹⁷². Para el desarrollo del presente trabajo, las mismas fueron obtenidas de “American Tissue Cell Culture” (ATCC) y fueron mantenidas en cultivo en RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10 % de suero bovino fetal decomplementado (SBF) (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) inactivado, L-glutamina (2mM) y gentamicina (40µg/ml) a 37 °C en estufa con 5 % CO₂.

La línea celular F3II fue establecida a partir de un carcinoma mamario murino hormono-independiente originado espontáneamente en ratones BALB/c y también ha sido descrita con anterioridad¹⁷³. Las células F3II fueron cultivadas de manera similar a las células HeLa utilizando RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF) (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) decomplementado e inactivado, L-glutamina (2mM) y gentamicina (40 µg/ml) a 37 °C en estufa con 5 % CO₂.

La línea celular CT26 proviene de un adenocarcinoma colorectal murino no diferenciado que fue establecido a partir de un tumor transplantable inducido por N-nitroso-N-metiluretano en ratones BALB/c¹⁷⁴. Las células CT26 fueron cultivadas en D-MEM (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10 % de SBF (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) decomplementado e inactivado, L-glutamina (2 mM), estreptomina (100 U/ml), y penicilina (100 mg/ml) a 37 °C en estufa con 5 % de CO₂.

La línea celular murina LP07 fue establecida a partir de un carcinoma de pulmón originado en ratones BALB/c¹⁷⁵. Éstas fueron cultivadas en D-MEM (*Gibco*, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10 % de SBF decomplementado e inactivado, L-glutamina (2mM), gentamicina (40 µg/ml) a 37 °C en estufa con 5 % de CO₂.

Dichas líneas celulares tumorales son adherentes, crecen formando una monocapa y fueron mantenidas en cultivo por sucesivos repiques. Para la amplificación de dichas células se utilizó una solución de 0,05 % tripsina / 0,02 % EDTA.

Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

A partir de 20 ml de sangre periférica heparinizada de voluntarios sanos se hizo una dilución al medio en solución fisiológica de la misma y se generó un gradiente con Ficoll-PaqueTM PLUS (*GE Healthcare Bio-Sciences*, Uppsala, UI, Suecia) (densidad = 1,077 g/cm³) centrifugando a 2000 r.p.m. por 20 minutos. Se obtuvieron las células mononucleares levantando el halo formado en la interfase. Luego se realizaron 3 lavados con solución fisiológica centrifugando a 1200 r.p.m. por 10 minutos. Por último las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) conteniendo L-glutamina (2 mM), gentamicina (40 µg/ml) y 10 % de suero bovino fetal inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) y se realizaron con las mismas los ensayos de proliferación celular.

Obtención de monocitos

Los monocitos se obtuvieron a partir de sangre periférica humana de donantes sanos, a través de un gradiente de la siguiente manera: Cincuenta mililitros de sangre entera o un *Buffy Coat* se diluyeron al medio o al tercio respectivamente en solución fisiológica para luego proceder a la obtención de las células mononucleares. Para esto la sangre así diluida se depositó suavemente sobre un gradiente de Ficoll-PaqueTM PLUS (*GE Healthcare Bio-Sciences*, Uppsala, UI, Suecia) (densidad = 1,077 g/cm³) en tubos cónicos de 50 ml (10 ml de Ficoll-Paque + 40 ml de sangre). Luego se centrifugó durante 20 minutos a 2000 r.p.m. a temperatura ambiente en una centrífuga Sorvall y se tomó cuidadosamente la banda correspondiente a las células mononucleares con pipeta pasteur. Sobre dichas células, posteriormente, se realizaron dos lavados con solución fisiológica. El pellet de las células mononucleares obtenido se resuspendió en 2 ml de

buffer T1 (Tyrode), 0,8 % EDTA, 0,9 % NaCl y 5 % de suero bovino fetal de complementado (SBF) (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) y se procedió al agregado secuencial de 8 µl de una solución de NaCl 9 % cada 10 min, tres veces. Este procedimiento modifica principalmente la densidad de los monocitos, pero no la de los linfocitos, para facilitar la posterior separación en gradiente de Percoll.

Posteriormente se arma un gradiente discontinuo de Percoll (*Pharmacia Fine Chemicals*, Dorsal, PQ, Suecia) en tubos cónicos de 15 ml con bandas de diferente densidad: 40 %, 45 %, 50 % y 56 % de Percoll; la banda correspondiente a 50 % de Percoll se mezcló previamente con la solución de células mononucleares tratadas con solución de NaCl. El gradiente así formado se centrifugó durante 15 minutos a 1600 r.p.m. Los monocitos se recuperaron de la zona entre las bandas correspondientes a 45 % y 50 % de Percoll. Las células se lavaron con solución fisiológica centrifugando a 1300 r.p.m. por 8 minutos. El recuento de monocitos al microscopio y la verificación de la purificación se realizaron utilizando un colorante que tiñe en forma diferencial monocitos, como es el rojo neutro (*Sigma*, St. Louis, MO, USA). Los monocitos así obtenidos se cultivaron en RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10 % de suero bovino fetal de complementado (SBF) (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) inactivado, L-glutamina (2mM) y gentamicina (40 µg/ml) a 37 °C en estufa con 5 % CO₂.

Generación de Células Dendríticas (CDs)

Las CDs se generaron a partir de monocitos de sangre periférica humana de donantes sanos. Los monocitos se obtuvieron como se detalló previamente, y una vez obtenidos los mismos, se resuspendieron en RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) suplementado con L-glutamina (2 ng/ml), gentamicina (40 µg/ml), GM-CSF (800 U/ml), IL-4 (500 U/ml) y 10 % de SBF (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) inactivado. Se cultivaron aproximadamente 20x10⁶ células en placas de Petri de 100 x 20 mm durante 5-7 días en estufa a 37 °C y 5 % CO₂. La pureza de éstas CDs fue confirmada mediante

inmunomarcaciones específicas para CDs, y se utilizaron para el estudio de expresión de MHC de clase I cultivos con una pureza mayor al 95 %.

Obtención de esplenocitos murinos

Para obtener los esplenocitos murinos, se sacrificó un ratón hembra BALB/c de 8 semanas de edad y se le extrajo el bazo. Posteriormente, éste, fue disgregado de forma estéril en flujo laminar en una placa de petri utilizando inicialmente bisturís y luego una malla metálica y el émbolo estéril de una jeringa en presencia de RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA). Los esplenocitos obtenidos se lavaron tres veces con RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) centrifugando a 2000 r.p.m. por 5 minutos. De esta forma se obtuvieron aproximadamente 8×10^7 células que se cultivaron en RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10 % de suero bovino fetal decomplementado (SBF) (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) inactivado, L-glutamina (2mM) y gentamicina (40 $\mu\text{g/ml}$) a 37 °C en estufa con 5 % CO₂ para realizar el ensayo de proliferación celular.

Ensayos de proliferación linfocitaria

Los ensayos de proliferación de las células mononucleares de sangre periférica humana o de esplenocitos murinos, se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo en U en las que se colocaron 1×10^5 células por pocillo, en medio RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) conteniendo L-glutamina (2 mM), gentamicina (40 $\mu\text{g/ml}$) y 10 % de SBF decomplementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA). Las células fueron tratadas, como se detalla más adelante, con o sin IL-2 (8 ng/ml) o anticuerpos anti-CD3 (OKT3) para estimular la proliferación celular en el caso de células humanas y con concanavalina A (ConA – 2 $\mu\text{g/ml}$) para el caso de los esplenocitos murinos, agregando SLPIrh (4 $\mu\text{g/ml}$) o buffer control a los pocillos de cultivo. Las células fueron incubadas durante 5 días a 37 °C en estufa con 5 % de CO₂. Luego las células fueron tratadas con timidina tritiada ([methyl-³H] thymidine; 5 $\mu\text{Ci/ml}$, actividad específica 20 Ci/mmol;

Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) por 18 hs. La incorporación de timidina marcada fue medida utilizando un contador de centelleo líquido (*Wallac 1214 Rackbeta*, Turku, WF, Finlandia).

Estimulación con IL-2 y con ConA

En una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo en U se colocaron 1×10^5 células mononucleares o esplenocitos murinos resuspendidos en medio de cultivo RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10 % de suero bovino fetal decomplementado (SBF) (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) inactivado, L-glutamina (2mM) y gentamicina (40 $\mu\text{g/ml}$). Las células se trataron simultáneamente con IL-2 (8 ng/ml) o con ConA (2 $\mu\text{g/ml}$) y SLPIrh (4 $\mu\text{g/ml}$) y se incubaron durante 5 días a 37 °C en estufa con 5 % de CO₂. Finalmente se cuantificó la proliferación por incorporación de timidina tritiada utilizando un contador de centelleo líquido (*Wallac 1214 Rackbeta*, Turku, WF, Finlandia) como se indicó más arriba.

Estimulación con anticuerpo anti-CD3

Placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano fueron tratadas con anticuerpos anti-CD3 (OKT3) en buffer carbonato (Na₂CO₃ 15 mM; NaHCO₃ 34 mM; azida sódica 3 mM) a pH = 9,6 durante 2 horas a 37 °C. Transcurrido dicho tiempo, se realizaron 2 lavados con solución fisiológica sobre la placa y se agregaron 1×10^5 células mononucleares suspendidas en 100 μl de RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10 % de SBF (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) inactivado, L-glutamina (2mM) y gentamicina (40 $\mu\text{g/ml}$) por pocillo. Algunos grupos fueron tratados con SLPIrh (4 $\mu\text{g/ml}$). Finalmente se incubó la placa durante 5 días en estufa a 37 °C con 5 % CO₂ y se midió la proliferación por incorporación de timidina tritiada utilizando un contador de centelleo líquido (*Wallac 1214 Rackbeta*, Turku, WF, Finlandia) como se indicó más arriba.

Obtención de células Natural Killer humanas

A partir de un *Buffy Coat* se obtuvieron los PBMCs de manera similar a lo detallado más arriba. Luego, las células mononucleares de sangre periférica obtenidas se resuspendieron en 500 μ l de RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10 % de SBF (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) inactivado, L-glutamina (2mM) y gentamicina (40 μ g/ml) y se colocaron en una columna de lana de nylon (tipo 200L) previamente lavada con PBS estéril, RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) y RPMI completo. La columna fue preparada empaquetando 0,6 grs. de lana de nylon seca dentro de una jeringa plástica estéril de 10 ml. Las células se dejaron en la columna por una hora a 37 °C. Luego, la elución se llevó a cabo utilizando 30 ml. de RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10 % de SBF (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) inactivado, L-glutamina (2mM) y gentamicina (40 μ g/ml). Las células eluidas (principalmente linfocitos T y NK) fueron resuspendidas en PBS estéril ($3,5 \times 10^6$ células/ml) y tratadas con anticuerpos anti-CD3 (OKT3) por 45 min. Luego se agregó complemento de conejo (1 ml por cada 3×10^6 células tratadas) y se incubó por 1 hr a T amb. Posteriormente se realizaron 3 lavados con RPMI completo y las células obtenidas fueron utilizadas en los ensayos de citotoxicidad como células NK efectoras.

Ensayo de citotoxicidad

Células HeLa fueron cultivadas en placa de 96 pocillos de fondo plano (3×10^5 células por pocillo) en 200 μ l de RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) conteniendo L-glutamina (2 mM), gentamicina (40 μ g/ml) y 10 % de SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) y fueron tratadas con SLPIrh (4 μ g/ml) o con buffer (control) durante 24 hs. Luego de transcurrido este tiempo, las células HeLa fueron enfrentadas, en los mismos pocillos, con células NK (relación NK:HeLa 5:1). Las células NK fueron obtenidas a partir de sangre periférica de donadores sanos como se indica más arriba. La citotoxicidad fue medida utilizando el kit no radiactivo *Cyto Tox*

96 *Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Expresión y purificación de SLPI recombinante humano (SLPIrh)

A partir de bacterias *E. coli* BL21 CodonPlus (DAE)-RIL (Novagen, Darmstadt, Hesse, Alemania), productoras de SLPIrh, generadas en nuestro laboratorio¹⁷⁶ se obtuvo un precultivo inoculando las mismas a 7,5 ml de medio LB estéril suplementado con Ampicilina (100 µg/ml) y Cloranfenicol (50 µg/ml) e incubando a 37 °C durante una noche. Luego, 500 ml de medio LB con Ampicilina (100 µg/ml) y Cloranfenicol (50 µg/ml) fueron inoculados con 5 ml del precultivo obtenido en el paso anterior. Dicho cultivo fue incubado en agitación a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0,6 medida a 600 nm. Logrado este valor, la expresión de SLPIrh fue inducida por el agregado de isopropiltiogalactósido (IPTG) (1mM). Una vez transcurridas 3 hs de inducción con agitación continua a 28 °C; el cultivo fue centrifugado a 7000 r.p.m. durante 7 min.

Los pellets se resuspendieron en 2 ml de buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 10 mM; pH 8) y se agregó lisozima hasta llegar a una concentración final de 1 mg/ml. También se incorporaron DNAsa y RNAsa a una concentración final de 10 µg/ml. Se dejó actuar a estas enzimas durante 30 minutos. Finalmente las bacterias fueron lisadas por ultrasonido con 7 pulsos de 60 watts de 30 segundos de duración utilizando un sonicador (*Sonics – Vibra Cell*, Newtown, CT, USA). Todo el procedimiento se realizó en hielo para evitar la proteólisis. Luego el lisado se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos a una temperatura de 4 °C. La fracción soluble se recuperó y fue adicionada a 800 µl de resina de Niquel- ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) (*Qiagen GmbH*, Hilden, Westphalia, Alemania) previamente equilibrada en buffer de lisis y se incubó durante 1 hora a 4 °C. Durante este tiempo se produce la unión de la cola de 6 histidinas del SLPIrh al Ni⁺² complejado en la resina.

Posteriormente se realizaron dos lavados de 15 ml con una solución NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 20 mM; pH 8 (buffer de lavado 20) luego otros dos lavados con 15 ml de una solución NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 40 mM; pH 8 (buffer de lavado 40) y por último dos lavados de 5 ml con NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 75 mM; pH 8 (buffer de lavado 75). Finalmente, el SLPIrh fue eluido de la resina por el agregado de 2 ml de una solución NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM; pH 8 (buffer de elución 250). La elución se repitió tres veces para obtener el mayor rendimiento posible.

Con objeto de disminuir la concentración de imidazol en las muestras de SLPIrh, las distintas eluciones fueron sujetas a diálisis en un buffer fosfato que posee una concentración final de 2,5 mM de imidazol. La diálisis fue realizada utilizando una membrana con un tamaño de poro de 12 kDa previamente lavada. El SLPIrh en buffer de elución 250 (2 a 6 ml) fue incorporado a la bolsa de diálisis y luego sumergido en una solución de NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH = 7,6 e imidazol, cuya concentración varía según el volumen de SLPI utilizado. Así finalmente se obtiene el SLPIrh en una solución NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 2,5 mM, pH = 7,6. Todo el material utilizado en este proceso fue esterilizado previamente.

Antes de utilizar el SLPIrh en los experimentos *in vitro* e *in vivo* las fracciones eluidas fueron purificadas utilizando una columna de polimixina B - Agarosa (*Sigma*, St. Louis, MO, USA) y la ausencia de LPS fue verificada usando el test de Limulus. (*Pyrotell - Associates of Cape Cod*, Falmouth, MA, USA)

Ensayo de inhibición de tripsina

Este ensayo fue realizado utilizando el sustrato cromogénico N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (*Sigma*, St. Louis, MO, USA) que al ser clivado por la tripsina genera p-nitroanilida, un producto de color amarillo. La proteína recombinante (SLPIrh) obtenida en la purificación se incubó con diferentes concentraciones de tripsina (0,02 - 0,05 %) durante 5 minutos a 37 °C. Finalmente se agregaron 40 μl de una solución que

contiene el sustrato cromogénico diluido 1 en 80 en buffer Tris (50 mM) a pH 7,4. La absorbancia se mide cada 2 minutos a 405 nm durante 20 minutos en un lector de placas de ELISA (*Labsystems Multiskan*, Londres, Inglaterra, Reino Unido).

Clonado de SLPIh en un vector de expresión eucariota.

El ARNm correspondiente a la proteína humana SLPI (SLPIh) se obtuvo a partir de células HeLa. Las células se lisaron en frío; luego se centrifugaron a 12000 r.p.m. y el sobrenadante se paso por una columna de poly-T agarosa para pegado específico de ARNm. Este se eluyó en 50 µl de buffer TE (Tris-EDTA). El ARNm así obtenido se utilizó en una reacción de transcripción reversa a ADNc utilizando oligo-dT como primers con la enzima retrotranscriptasa MMLV-RT (*Promega*, Madison, WI, USA).

Luego se obtuvo por PCR el fragmento completo correspondiente a la proteína SLPIh (incluido el péptido señal) usando dos primers específicos:

5'-GGCAGGAATCAAGCTTTCACA-3' y 5'-TCACCATGAAGTCCAGCGGC-3'.

El producto de PCR de 415 pares de bases se separó por electroforesis en un gel de agarosa 1,5% con bromuro de etidio (BrEt), la banda correspondiente se escindió y se purificó el ADN utilizando el kit Quick Gel Extraction (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA). El fragmento así purificado se clonó en el vector de clonado pGemT easy vector (*Promega*, Madison, WI, USA), que permite clonar productos de PCR amplificados con Taq polimerasa, ya que posee dos nucleótidos timidina protruyentes en los extremos 3'.

Ésta construcción se electroporó en bacterias *E. coli* JM 109; posteriormente se seleccionó una colonia aislada y se creció para la purificación del plásmido pGemT-SLPIh. Para corroborar la correcta secuencia del gen se secuenciaron los 500 pares de bases incluidos entre los sitios T7 y SP6 del plásmido, que incluyen al gen SLPIh, en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) de la Universidad Nacional de La Plata. La comparación y homología de secuencia se realizó usando los servicios en red de EMBL, Swissprot, y

GenBank molecular biology databases (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, MD, USA).

El plásmido pGemT-SLPIh se cortó con la enzima de restricción *EcoRI* (*New England Biolabs*, Ipswich, MA, USA); el producto de esta digestión se separó por electroforesis en un gel de agarosa 1,5% teñido con BrEt.; la banda correspondiente al gen SLPIh se escindió y se purificó. El gen SLPIh así obtenido se ligó en el vector pcDNA3 (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) para expresión eucariota. Dicha construcción se electroporó en bacterias *E. coli* JM 109 para su amplificación. De esta forma, pudo obtenerse el gen y su orientación se verificó por PCR utilizando como primers el correspondiente al sitio T7: 5'-TACGACTCACTATAGGGCGAA-3' y los ya descriptos anteriormente utilizados para obtener dicho gen.

Análisis de moléculas de superficie por citometría de flujo

Marcaciones de monocitos y CDs

Monocitos (4×10^6 células) y CDs (5×10^6) fueron incubados en estufa a 37 °C con 5 % CO₂ en medio RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) conteniendo L-glutamina (2 mM), gentamicina (40 µg/ml) y 10 % de SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) con SLPIrh (4 µg/ml) o con buffer de dilución (control). Posteriormente fueron marcados para estudiar la modificación de moléculas de superficie por acción del SLPI. Para esto, luego de la incubación, dichas células se centrifugaron a 2000 r.p.m., se resuspendieron en PBS frío y luego se realizaron marcaciones directas o indirectas según los anticuerpos utilizados. Para las marcaciones indirectas las células se incubaron en frío con el anticuerpo primario de ratón, a las concentraciones óptimas de cada uno por 40 minutos; luego se lavaron con PBS frío y se agregó seguidamente el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Dako*, Glostrup, Hovedstaden Denmark) por 40 minutos a 4 °C. Para los controles negativos se utilizó un anticuerpo irrelevante de ratón del mismo isotipo que el anticuerpo primario utilizado en los demás grupos. Para las

marcaciones directas, los monocitos y las CDs se incubaron en frío durante 40 minutos con el anticuerpo de ratón conjugado a ficoeritrina (R-PE) o a FITC a la concentración indicada por el fabricante. Como control de isotipo se utilizó un anticuerpo de ratón irrelevante también marcado con el fluorocromo correspondiente. Finalmente las células se lavaron con PBS-azida de sodio en frío, se resuspendieron en 400 µl de PBS frío en los tubos de FACS y la fluorescencia se cuantificó por citometría de flujo mediante el citómetro FACSCalibur (*Becton Dickinson-BD*, San José, CA, USA). Luego, los resultados obtenidos se analizaron con el programa WinMDI para Windows versión 2.9.

Marcaciones de líneas celulares

Células HeLa tratadas o no con SLPIrh (4 µg/ml), clones de células F3II y de HeLa transfectados con el gen de SLPI humano o con el plásmido vacío (control) incubados en estufa a 37 °C con 5 % CO₂ en medio RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) conteniendo L-glutamina (2 mM), gentamicina (40 µg/ml) y 10 % de SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) fueron cultivados en placas de 6 pocillos (9x10⁵ células/pocillo) y cosechadas utilizando una solución de 0,04 % de EDTA. Dichas células se centrifugaron a 1200 r.p.m. y se resuspendieron en PBS frío. Luego se realizaron marcaciones directas o indirectas según los anticuerpos utilizados. El esquema seguido para las mismas fue similar al ya indicado para las marcaciones de monocitos. La intensidad de fluorescencia y los resultados se analizaron de la misma forma que lo indicado más arriba.

Anticuerpos monoclonales usados para citometría

Se enumeran a continuación los anticuerpos (Ac) utilizados en este trabajo de tesis y sus características:

Anticuerpos anti-humano: anti-CD54 (ICAM-1) (IgG1, R-PE) (*BD Pharmingen*TM, San Diego, CA, USA), anti-CD14 (IgG2a, R-PE) (*Caltag*, San Francisco, CA, USA), anti-HLA-A, B, C (MHC I) (IgG1, R-PE) (*BD Pharmingen*TM, San Diego, CA, USA), anti-HLA-DR, DP, DQ (MHC II) (IgG2a, R-PE), anti-CD29 (IgG1, R-PE) (*BD Pharmingen*TM, San Diego, CA, USA), Mouse IgG1 (Control de Isotipo, R-PE) (*Caltag*, San Francisco, CA, USA), Mouse IgG2a (Control de Isotipo, FITC) (*Caltag*, San Francisco, CA, USA), anti-HLA-DR (HB-55, IgG2a, *ATCC*, Rockville, MD, USA),

anti-CD18 (Ts1/18, IgG1, ATCC, Rockville, MD, USA), anti-CD86 (FUN-1, IgG1, *BD Pharmingen*TM, San Diego, CA, USA).

Anticuerpos anti-ratón: anti-CD29 murino (IgG2a, R-PE) (*BD Pharmingen*TM, San Diego, CA, USA), Anti-MHC Class I H2-D, (IgG2a, R-PE) (*BD Pharmingen*TM, San Diego, CA, USA), Rat IgG2a (control de Isotipo, R-PE, *BD Pharmingen*TM, San Diego, CA, USA)

ELISA sobre monocapa de células HeLa viables

Este ensayo se realizó sobre células HeLa tratadas o no con SLPIrh (4 µg/ml) o sobre células HeLa transfectadas transientemente con un oligonucleótido antisentido para SLPIh. Para esto, se cultivaron 4×10^4 células por pocillo, en medio RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) conteniendo L-glutamina (2 mM), gentamicina (40 µg/ml) y 10% de SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) en placa de 96 pocillos (fondo plano) hasta subconfluencia. Luego, se tomó el sobrenadante y las células fueron lavadas con solución fisiológica. A continuación se colocó el Ac. anti-HLA-A, B, C (W6/32, IgG2a, ATCC, Rockville, MD, USA) y/o el Ac. anti-CD54 (IgG2a, *Chemicon*, Temecula, CA, USA) y/o el Ac. Control de Isotipo (IgG2a, *Caltag*, San Francisco, CA, USA) en RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) conteniendo 5% de SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) y 0,1% de Azida sódica. Luego la placa fue incubada durante 90 min. a 37 °C y pasado este tiempo se lavaron las células dos veces con RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) conteniendo 5 % de SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) y 0,1 % de Azida sódica y dos veces con RPMI 1640 solo (*Gibco*, Grand Island, NY, USA). Luego, se agregó el Ac. de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa (*Sigma*, St. Louis, MO, USA) en RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) y entonces la placa se incubó por 60 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo se realizaron dos lavados con PBS conteniendo 5% de SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) y por último dos lavados con PBS solo. Luego, el revelado, se realizó utilizando 3,3',5,5' tetrametibenzidina (TMB, *Sigma*, St. Louis, MO, USA) y la reacción se detuvo con una solución de H₂SO₄ 1 N. Las absorbancias fueron

determinadas por lectura a 450 nm en lector de placas de ELISA (*Labsystems Multiskan*, Londres, Inglaterra, Reino Unido).

ELISA para estudiar producción de SLPIh

Sobrenadantes de cultivo de células HeLa (transfectadas o no) y clones de células F3II (productores de SLPIh) fueron cosechados para la determinación de la producción de SLPIh. Con dicho fin, se adhirió un anticuerpo monoclonal de conejo anti-SLPI humano (IgG1, 1 µg/ml) (*Hbt*, Uden, North Brabant, Holanda) a la superficie de las placas de 96 pocillos (de alta unión a péptidos) en PBS por 16 hs a 4 °C. Luego se descartó el medio y sin lavar se bloqueó la placa con BSA 0,5 % - Leche 1 % en PBS (1hr, 37°C). La placa luego fue lavada con PBS-Tween-20 (0,05 % - 0,1 %) 5 veces y después se incorporaron las muestras de sobrenadante de cultivo (1h, 37 °C). Se lavó 3 veces con PBS - Tween-20 (0,05 % - 0,1 %) y se agregó el segundo anticuerpo policlonal de conejo anti-SLPI humano (0,14 µg/ml), (*Hbt*, Uden, North Brabant, Holanda) en BSA 0,5% - Leche1% -PBS (90 min, 37 °C). Se repitió el lavado 5 veces y se adicionó para revelado el anticuerpo policlonal de cabra anti - IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1:1200) en BSA 0,5% - Leche1% - PBS (1hr, 37 °C). Finalmente se reveló utilizando 3,3',5,5' tetrametibenzidina (TMB, *Sigma*, St. Louis, MO, USA) y la reacción se detuvo con una solución de H₂SO₄ 1 N. Las absorbancias fueron determinadas por lectura a 450 nm en lector de placas de ELISA (*Labsystems Multiskan*, Londres, Inglaterra, Reino Unido). La curva estándar fue realizada a partir de SLPIrh producido y purificado en nuestro laboratorio.

Transfecciones de células HeLa y F3II

Transfección transiente de células HeLa con oligonucleótido antisentido para el SLPIh

Para la transfección transiente de células HeLa, se empleó un oligonucleótido antisentido con la siguiente secuencia: 5'-AGTGGTACTTCAGGTCGCCG-3' capaz de

hibridar con el extremo 5' del ARNm correspondiente al gen del SLPIh; por otro lado se utilizó como control el siguiente oligonucleótido sentido: 5'-TCACCATGAAGTCCAGCGGC-3'. Para llevar a cabo dicha transfección, en un placa de 96 pocillos de fondo plano se incubaron $2,5 \times 10^4$ células HeLa por pocillo en medio RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) conteniendo L-glutamina (2 mM), gentamicina (40 $\mu\text{g/ml}$) y 10 % de SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) durante 18 hs. en estufa a 37 °C con 5 % de CO_2 . Transcurrido este tiempo las células se lavaron tres veces con RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) precalentado a 37 °C. Por otro lado se prepararon las mezclas LipofectamineTM 2000 (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) – ADN (oligonucleótidos) de tal forma que la concentración final de los mismos por pocillo fue de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 0,3 μM respectivamente. Se agregaron las mezclas a las células en presencia de RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) y entonces se incubaron durante 4 hs. a 37 °C en estufa con 5 % de CO_2 . Pasado este tiempo se agregó SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) a una concentración final de 10 %, L-glutamina (2 mM) y gentamicina (40 $\mu\text{g/ml}$). Se dejaron en cultivo por 2 hs. y entonces se agregó o no, según el caso, IL-4 a una concentración final de 2 ng/ml por pocillo y se dejaron en cultivo durante 18 hs.

Transcurrido este tiempo, se tomaron los sobrenadantes de cultivo para estudiar la concentración de SLPIh en los mismos y sobre las células transfectadas se realizó un ELISA sobre monocapa para estudiar la expresión de MHC I.

Transfección estable de células HeLa y F3II con el gen del SLPIh y obtención de clones

Se realizó la transfección estable de dos líneas celulares. Células HeLa se transfectaron con el plásmido pcDNA3 conteniendo el gen del SLPIh en orientación sentido y antisentido, obtenido y purificado como se describió anteriormente. Por otro lado, también se transfectaron células tumorales murinas F3II con el plásmido pcDNA3 conteniendo el gen del SLPIh en orientación sentido. Para utilizar como controles se transfectaron también ambas líneas celulares con el plásmido pcDNA3 vacío. Dichas transfecciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: Se sembraron 2×10^5 células

por pocillo en placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) conteniendo L-glutamina (2 mM), gentamicina (40 µg/ml) y 10% de SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) durante 18 hs. en estufa a 37 °C con 5 % de CO₂. Por otro lado se prepararon las mezclas para las transfecciones utilizando 6 µl de LipofectamineTM 2000 (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) y 2 µg de ADN en 2 ml. de RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) en tubos de poliestireno estériles. Dichas mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min, luego se agregaron sobre las células previamente lavadas tres veces con RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) y se dejaron durante 4 hs. en estufa a 37 °C con 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo de incubación se agregó SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) a una concentración final de 10 %, L-glutamina (2 mM) y gentamicina (40 µg/ml). De esta forma se dejaron las células en cultivo durante 48 hs. y posteriormente se cambió el medio por otro de iguales características pero conteniendo además 500 µg/ml de G418 Sulfato (*Geneticin®*, *Gibco*, Grand Island, NY, USA) para realizar la selección de células que habían incorporado el plásmido. Luego de esto, el medio de cultivo con G418 Sulfato (*Geneticin®*, *Gibco*, Grand Island, NY, USA) se cambió cada dos días durante tres semanas hasta obtener cúmulos celulares aislados. Luego, los clones resistentes al G418 Sulfato (*Geneticin®*, *Gibco*, GIBCO, Grand Island, NY, USA) fueron seleccionados mediante la técnica de dilución terminal.

Ensayos de apoptosis

Medición de apoptosis basal en clones de F3II

Brevemente, células F3II (9x10⁵/pocillo) fueron cultivadas en placas de 6 pocillos durante 48 hs. en medio RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) conteniendo L-glutamina (2 mM), gentamicina (40 µg/ml) y 10 % de SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Los controles positivos de apoptosis fueron cultivados en RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) sin suplementar durante el mismo período de tiempo. Las células fueron marcadas utilizando el kit comercial *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I*

(*BD Pharmingen*TM, San Diego, CA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante y la apoptosis fue medida con un equipo FACSCalibur (*Becton Dickinson-BD*, San José, CA, USA). Luego, los resultados obtenidos se analizaron con el programa WinMDI para Windows versión 2.9.

Medición de apoptosis de células F3II tratadas con SLPIrh y con SLPIrh desnaturalizado

En este ensayo, células F3II (9×10^5 /pocillo) fueron cultivadas en placas de 6 pocillos durante 48 hs. en RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) conteniendo L-glutamina (2 mM), gentamicina (40 $\mu\text{g/ml}$), 10 % de SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) y 4 $\mu\text{g/ml}$ de SLPIrh o 4 $\mu\text{g/ml}$ de SLPIrh desnaturalizado por pH ácido o buffer control, a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Los controles positivos de apoptosis fueron cultivados en RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) sin suplementar, durante el mismo período de tiempo. Las células fueron marcadas y la apoptosis medida de la misma forma que lo descrito arriba.

Medición de apoptosis de células del clon 2C1 en presencia de plasma de ratones inoculados con el clon 2C1

Ratones hembra BALB/c de ocho semanas de edad fueron inoculados con 8×10^5 células del clon 2C1 y 48 hs. o 7 días después fueron sacrificados y se obtuvo el plasma a partir de la sangre extraída del seno retroorbital. Luego de esto, el plasma fue cultivado con 9×10^5 células/pocillo del clon 2C1 (mayor productor de SLPIh) en una placa de seis pocillos. Plasma de animales no inoculados fue usado como control del experimento. Los cultivos fueron realizados en RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10 % de SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA), L-glutamina (2 mM) y gentamicina (40 $\mu\text{g/ml}$) adicionando 33 % de SBF o de plasma control o de plasma de los ratones inoculados con el clon 2C1, a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Los controles positivos de apoptosis fueron cultivados en RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) sin suplementos durante el mismo período de tiempo. Las células fueron marcadas utilizando el kit comercial *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I* (*BD Pharmingen*TM, San Diego, CA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante y la apoptosis fue medida con un equipo FACSCalibur (*Becton*

Dickinson-BD, San José, CA, USA). Luego, los resultados obtenidos se analizaron con el programa WinMDI para Windows versión 2.9.

Ensayos de proliferación celular de clones de células F3II

Células del clon 2C1 y células control (transfectadas con el plásmido vacío) (3×10^4 /pocillo) fueron sembradas en placas de 96 pocillos de fondo plano y fueron incubadas en RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) conteniendo L-glutamina (2 mM), gentamicina (40 $\mu\text{g/ml}$), 10 % de SBF de complementado e inactivado (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO_2 . Luego de 24 hs. se agregó timidina tritiada ([methyl- ^3H] thymidine; 5 $\mu\text{Ci/ml}$, actividad específica 20 Ci/mmol; *Perkin-Elmer*, Boston, MA, USA) y las células se incubaron por otras 18 hs. Finalmente, las células fueron despegadas utilizando una solución de 0,05 % tripsina / 0,02 % EDTA y la incorporación de radioactividad fue medida utilizando un contador de centelleo líquido (*Wallac 1214 Rackbeta*, Turku, WF, Finlandia).

Preparación de microesferas conteniendo SLPIrh

Las microesferas de poli- ϵ -caprolactona (PCL) (PM: 14.000, *Sigma*, St. Louis, MO, USA) conteniendo SLPIrh fueron preparadas usando una emulsión agua-en-aceite-en-agua ($A_1/O/A_2$) basada en una técnica de evaporación de solvente. Brevemente, 400 mg de PCL fueron disueltos en 10 ml de diclorometano grado HPLC (solución O, *Anedra*, San Fernando, Buenos Aires, Argentina). Un mililitro de una solución conteniendo 0,8 mg de SLPIrh (A_1) y 30 mg de manitol fueron adicionados a la solución O, mezclando en un vórtex durante un minuto. Esta primera emulsión (A_1/O) fue entonces adicionada con agitación constante a 100 ml de una solución acuosa de 2 % de alcohol polivinílico (PVA, *Riedel-de Haën*, Seelze, Hannover, Alemania). La emulsión $A_1/O/A_2$ obtenida fue mantenida a temperatura ambiente por 4 hs. hasta la completa evaporación de diclorometano. Las microesferas fueron entonces centrifugadas (5000 r.p.m. a

temperatura ambiente) y lavadas tres veces con agua destilada. Finalmente las microesferas fueron liofilizadas.

Experimentos *in vivo*

Para los experimentos *in vivo*, se trabajó con ratones hembras BALB/c y hembras Nude (Swiss) de ocho semanas de edad que fueron comprados al bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y mantenidos en el bioterio del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires para realizar los experimentos. Parte de dichos experimentos *in vivo* también se realizaron en el Departamento Bioterio y Cáncer Experimental, Área Investigación del Instituto de Oncología “A.H. Roffo” y en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral.

Los animales fueron inoculados con células F3II transfectadas con el gen del SLPI_h (clones B3 y 2C1) o con las células control (F3II transfectadas con el pcDNA3 vacío) de forma subcutánea en el flanco izquierdo. Para los experimentos con ratones BALB/c se inocularon 8×10^5 células mientras que para los experimentos con ratones Nude se inocularon 5×10^6 de células por animal, resuspendidas, en ambos casos, en 200 μ l de medio RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) libre de suero. El largo (L) y el ancho (W) del tumor fueron medidos utilizando un calibre tres veces por semana y el volumen tumoral (V) fue calculado utilizando la fórmula $V = (L \times W^2)/2$.

Para el estudio del efecto del SLPI_{rh} aplicado de forma exógena sobre el crecimiento tumoral en distintos modelos, se inocularon hembras BALB/c de ocho semanas de edad con 8×10^5 células F3II o con 5×10^5 células CT26 o con 2×10^5 células LP07. La administración de SLPI_{rh} y SLPI_{rh} desnaturalizado por pH ácido fue realizada inoculando 100 μ l de una solución acuosa conteniendo 4 μ g/ml de la proteína en el sitio de inyección de las células tumorales al inicio del experimento, y dentro del tumor cuando éste comenzaba a ser palpable. Como control se inoculó el buffer de dilución de la proteína. Dichas inoculaciones se realizaron 3 veces por semana.

Las microesferas cargadas con SLPIrh (30 mg de microesferas suspendidas en 400 μ l de solución fisiológica) fueron inyectadas en ratones hembra BALB/c de ocho semanas de edad desde el día 2 por vía intraperitoneal, una vez por semana durante cuatro semanas y el volumen tumoral fue medido durante ese período de tiempo.

En todos los casos se consideró como día cero (0) al día de inoculación de las células tumorales.

Depleciones de poblaciones celulares

Las depleciones de las distintas subpoblaciones leucocitarias (células NK, y Neutrófilos) se realizaron *in vivo* siguiendo protocolos ya establecidos^{78,177}.

Para la depleción de células NK en ratones BALB/c se utilizó el anticuerpo comercial de conejo anti asialo GM1 (*Wako*, Osaka, Kansai, Japón) diluido 1 en 4 e inoculado vía intraperitoneal (i.p.) (100 μ l/ratón) los días -1, 1, 3, 7, 10, 14, 17, 21 y 24, considerando día 0 al día de la inoculación de las células tumorales.

Para la depleción de Neutrófilos (PMN) se inocularon, tanto en ratones BALB/c como en Nude, por vía i.p. 500 μ l de sobrenadante de cultivo del hibridoma RB6-8C5 los días -3, -2, -1, 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25, 27, 29, 32, 34, 36, 39, 41, 43, 46, 48 y 50, considerando día 0 al día de la inoculación de las células tumorales.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y para la comparación entre medias se utilizaron los test de Student-Newman-Keuls y Dunnett según se indica en la leyenda de las figuras. La comparación entre grupos en los estudios *in vivo* fue realizada utilizando el test *t* de Student para datos no apareados. Se consideró como significativo un valor de $p < 0,05$ (*), y como altamente significativo un valor de $p < 0,01$ (**), y $p < 0,005$ (***)

1. EFECTO DEL SLPI SOBRE CÉLULAS EPITELIALES

1.1 Tratamiento con SLPIrh exógeno

Debido a que muchas moléculas de superficie cumplen roles clave en lo que respecta al crecimiento tumoral y a la metástasis se estudió el efecto del SLPI sobre la expresión de algunas de estas moléculas sobre la línea celular epitelial HeLa (originaria de un carcinoma de cuello uterino). Las moléculas analizadas fueron: MHC de clase I, ICAM-1/CD54 y la integrina CD29/ β_1 -integrina). Las dos primeras moléculas analizadas se estudiaron realizando un ensayo de ELISA sobre monocapa de células tumorales viables; en tanto que la expresión de CD29 se estudió por citometría de flujo. La primera técnica permite analizar las moléculas estando las células en monocapa; en cambio, para el análisis por citometría de flujo fue necesario despegar las células previo a la marcación. Como se observa en la **Figura 9**, el tratamiento de las células HeLa con SLPIrh (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 18 hs) disminuyó la expresión de MHC de clase I. Este efecto no fue específico para esta molécula, ya que también se observó una disminución en la expresión de la molécula de adhesión perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas ICAM-1/CD54 (**Figura 9**).

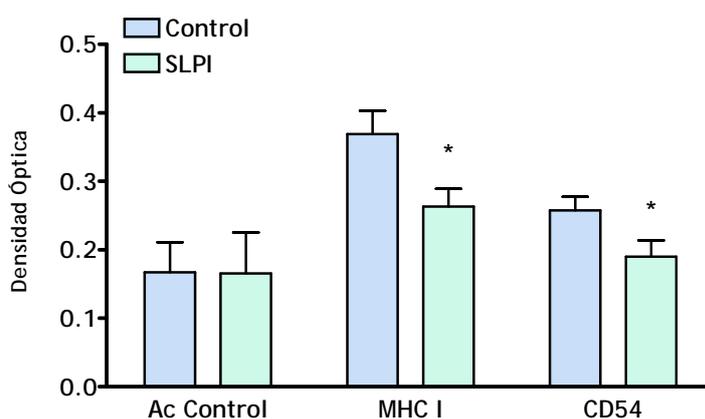


Figura 9. Efecto del SLPIrh sobre la expresión de CD54 (ICAM-1) y MHC I sobre células HeLa. Células HeLa fueron incubadas con SLPIrh (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 18 hs y posteriormente se midió sobre las mismas la expresión de MHC I y de CD54 mediante un ELISA sobre monocapa de células viables. Los datos se expresan como la Media \pm DS. Se muestra un experimento representativo de tres. * $p < 0,05$ (Test *t* de Student para datos apareados).

Al analizar la expresión de la molécula β_1 -Integrina/CD29 sobre la misma línea celular por citometría de flujo, se observó que el agregado exógeno de SLPIrh produjo también una disminución en la expresión de esta molécula (**Figura 10**).

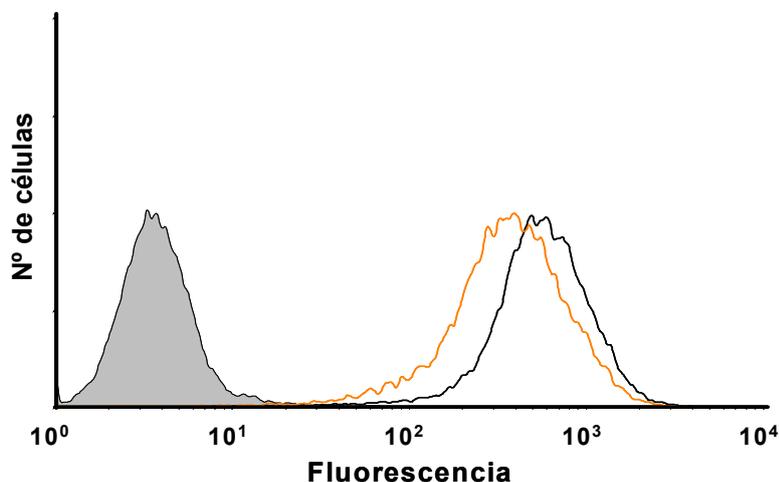


Figura 10. Expresión de β_1 -Integrina/CD29 sobre células HeLa tratadas con SLPIrh. Células HeLa sin tratar (histograma negro) o tratadas (histograma rojo) con SLPIrh (4 μ g/ml) durante 18 hs fueron despegadas utilizando EDTA 0,04 % y marcadas con un anticuerpo monoclonal fluorescente anti-CD29. Se muestran los resultados obtenidos en un experimento representativo de cinco experimentos independientes. El control de isotipo se muestra en gris y fue similar para ambos grupos.

Estos resultados sugieren que SLPI es capaz de modificar la expresión de diferentes moléculas de superficie y, por lo tanto, podría tener un rol en el reconocimiento de las células tumorales por parte del sistema inmune y/o en la inducción de metástasis.

1.2 Efecto de la modulación de la producción endógena de SLPI

Seguidamente se hipotetizó que los niveles de expresión de las moléculas de superficie analizadas en la sección anterior podrían ser modificados por los niveles endógenos de SLPI producido por las células epiteliales. Para corroborar esta hipótesis, se decidió modificar los niveles endógenos de SLPI por acción de citoquinas. Para lo cual, células HeLa fueron tratadas con IFN- γ (8 ng/ml) y los sobrenadantes de cultivo, cosechados a las 24 hs, fueron evaluados para determinar el contenido de SLPI. En la **Figura 11** se observa que el tratamiento de las células HeLa con IFN- γ disminuyó la producción de SLPI. Dado que IFN- γ es considerada una citoquina patognomónica del perfil Th1, el

siguiente paso fue evaluar el posible efecto de citoquinas pertenecientes al patrón Th2 sobre la producción de SLPI. Células HeLa fueron tratadas entonces durante 24 hs con IL-4 (2 ng/ml) y posteriormente se midió SLPI en el sobrenadante de los cultivos. Como se observa en la **Figura 11** tanto IL-4 como TNF- α (citoquina utilizada como control positivo¹¹⁹) aumentaron la producción de SLPI.

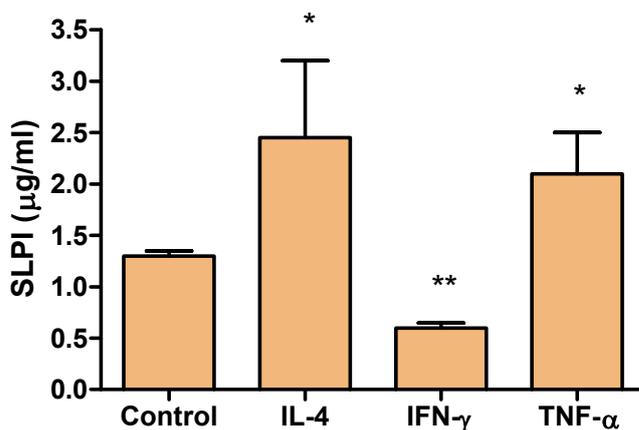


Figura 11. Regulación de la Producción de SLPI en células HeLa. Células HeLa fueron tratadas con IL-4 (2 ng/ml), IFN- γ (8 ng/ml) o TNF- α (2 ng/ml) durante 24 hs. Posteriormente se cosechó el sobrenadante de cultivo y se midió la concentración de SLPI en el mismo por un ensayo de ELISA. Los datos se expresan como la Media \pm ESM de tres experimentos diferentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (*Test t de Student para datos apareados*).

Teniendo en cuenta estos resultados, se analizó la regulación que podrían ejercer IL-4 e IFN- γ sobre la expresión de MHC I y de CD54 en las células HeLa. Para ello, las mismas fueron cultivadas en presencia de IL-4 (2 ng/ml) o IFN- γ (8 ng/ml) durante 24 horas y posteriormente se realizó un ELISA sobre monocapa de éstas células estudiando la expresión de MHC I y de CD54. Como puede observarse en la **Figura 12**, las células HeLa cultivadas en presencia de IL-4 (citoquina que había aumentado la expresión de SLPI en estas células - **Figura 11**) presentaron niveles mas bajos de expresión de MHC I; pero no de CD54; mientras que el tratamiento con IFN- γ no produjo diferencias significativas en ninguno de los casos.

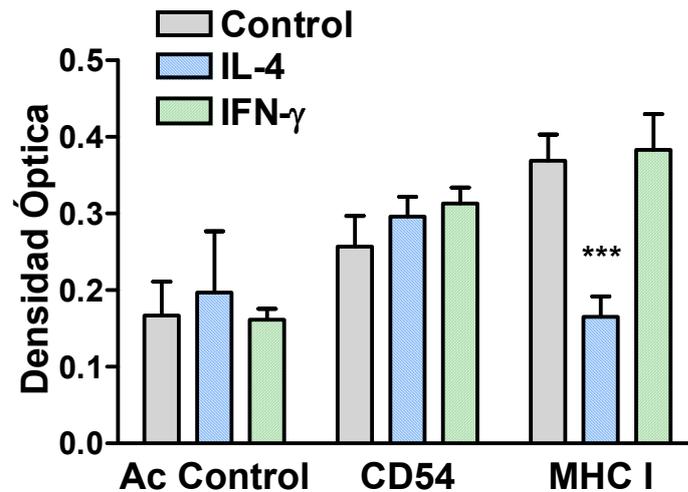


Figura 12. Regulación de la Expresión de CD54 (ICAM-1) y MHC I sobre células HeLa por IL-4 e IFN- γ . Células HeLa fueron incubadas con IL-4 (2 ng/ml) o IFN- γ (8 ng/ml) durante 24 hs y posteriormente se midió sobre las mismas la expresión de MHC I y de CD54 mediante un ELISA sobre monocapa de células viables. Se muestra un experimento representativo de tres. Los datos se expresan como la Media \pm DS. *** $p < 0,001$ (ANOVA con post test Student-Newman-Keuls).

Las células HeLa (como la mayoría de las células epiteliales) tienen la capacidad de producir SLPI; por lo tanto se decidió también evaluar un posible efecto autócrino de esta proteína, y a la vez corroborar una correlación entre los niveles de SLPI producido por las células epiteliales y los cambios en la expresión de CD29 y MHC de clase I. Para esto, se generaron células HeLa con diferente capacidad de producción de SLPI.

En primer lugar se generaron células HeLa con menor capacidad de producción de SLPI a través de una transfección transiente con un oligonucleótido antisentido para SLPIh. En la **Figura 13** puede observarse que las células transfectadas produjeron niveles inferiores de ésta proteína que las células HeLa control.

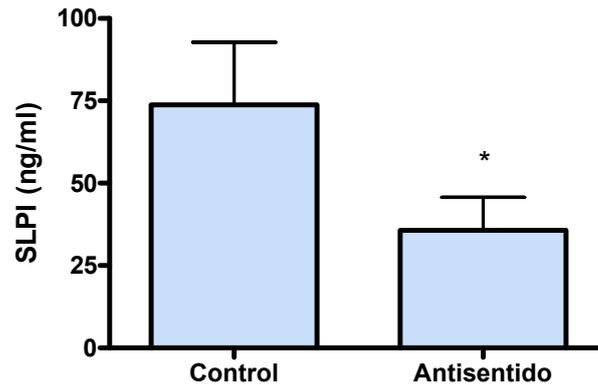


Figura 13. Disminución de la producción de SLPI en células HeLa por transfección transiente con oligonucleótido antisense. La concentración de SLPI fue determinada en sobrenadantes de cultivo de células HeLa transfectadas con el oligonucleótido antisense o con un oligonucleótido irrelevante (Control). Los datos se expresan como la Media \pm DS. Se muestra un experimento representativo de tres. * $p < 0,05$ (Test *t* de Student para datos apareados).

Luego, se analizó la expresión de MHC de clase I sobre las células HeLa transfectadas. Como se observa en la **Figura 14**, pudo verificarse que la disminución del SLPI endógeno se correlacionaba con un aumento de MHC de clase I sobre la superficie celular. Además se pudo observar que el tratamiento con IL-4 (2 ng/ml) de las células HeLa transfectadas aumentaba significativamente la expresión de MHC de clase I.

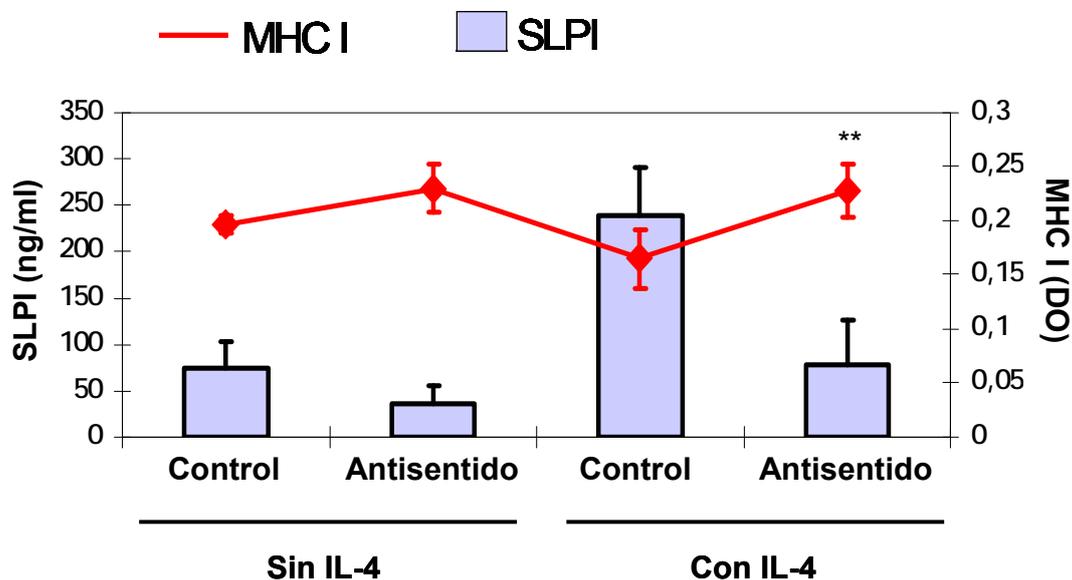


Figura 14. Efecto del bloqueo de la producción de SLPI endógeno en células HeLa sobre la expresión de MHC I. La concentración de SLPI fue determinada en sobrenadantes de cultivo de células HeLa transfectadas con el oligonucleótido antisense o con un oligonucleótido irrelevante (Control). Posteriormente dichas células transfectadas fueron tratadas o no durante 24 hs con IL-4 (2 ng/ml); luego, sobre las mismas se realizó un ELISA sobre monocapa para medir la expresión de MHC I. Los datos se expresan como la Media \pm DS. Se muestra un experimento representativo de tres. ** $p < 0,01$ para MHC I Antisense vs Control (Test *t* de Student para datos apareados)

Luego, se decidió estudiar la expresión de CD29 y su posible modulación por el SLPI producido de forma endógena en las células HeLa. Para esto, se decidió transfectar esta línea con el gen de SLPIh de forma estable para que sobreexpresara esta proteína.

Como se describe en la sección de Materiales y Métodos las células fueron transfectadas con el gen del SLPIh ligado en un vector de expresión eucariota (pcDNA3). Por la técnica de dilución terminal se pudieron aislar clones sobreproductores de dicha proteína. En particular, se trabajó con el clon 3A, que, como puede verse en la **Figura 15**, produjo niveles de SLPIh significativamente superiores a las células control.

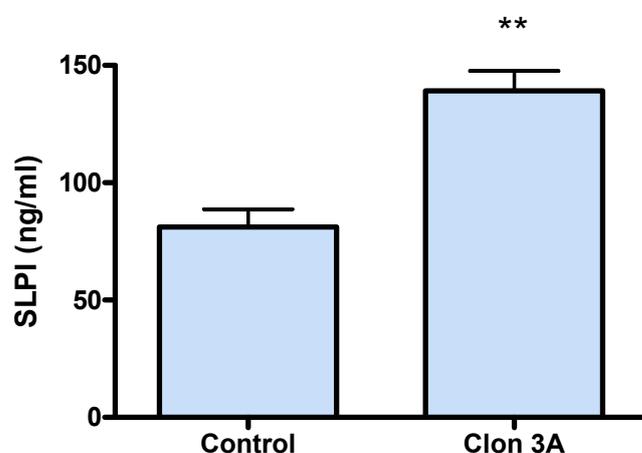


Figura 15. Aumento de la producción de SLPI en células HeLa transfectadas de forma estable. La concentración de SLPI fue determinada en sobrenadantes de cultivo de células HeLa transfectadas con el plásmido pcDNA3 conteniendo el gen del SLPIh o con el plásmido sin inserto (Control). Los datos se expresan como la Media \pm DS. Se muestra un experimento representativo de tres. ** $p < 0,01$ (Test *t* de Student para datos apareados)

Sobre este clon, se decidió estudiar la expresión de CD29. En la **Figura 16** se puede ver que el mismo presentaba una disminución en la expresión de β_1 -Integrina del 29 % al compararse frente a las células control (aquellas que fueron transfectadas con el plásmido pcDNA3 sin inserto). Para ver si estas células control eran sensibles también al tratamiento con SLPIrh exógeno, las mismas fueron incubadas en presencia de SLPIrh (4 μ g/ml, 18 hs) y pudo también observarse una clara disminución (41 %) en la expresión de CD29 sobre las mismas.

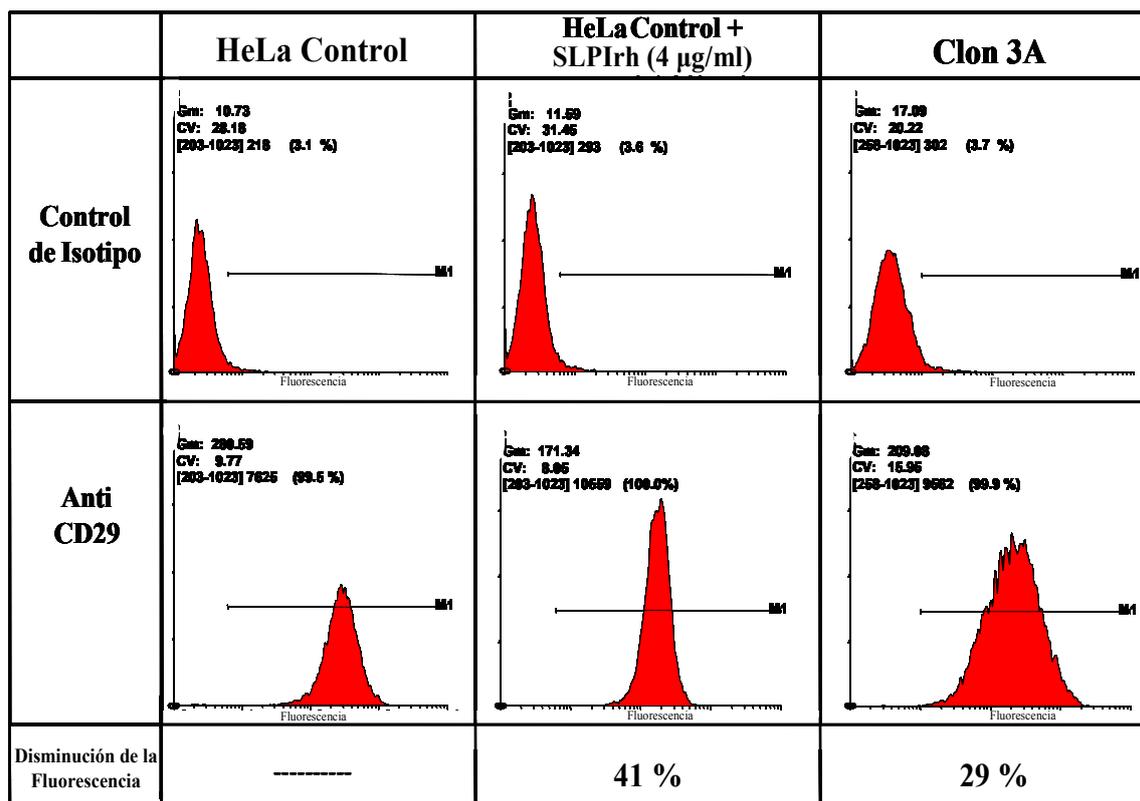


Figura 16. Expresión de β_1 -Integrina/CD29 sobre células HeLa transfectadas. Células HeLa transfectadas con el plásmido vacío (HeLa control), tratadas o no con SLPIrh (4 µg/ml), 18 hs a 37°C y células transfectadas sobreproductoras de SLPIh (clon 3A) fueron despegadas con EDTA 0,04 % y marcadas con anticuerpo monoclonal fluorescente anti-CD29. Se muestran los resultados obtenidos en un experimento representativo de tres experimentos independientes. El porcentaje de disminución de la fluorescencia fue calculado a partir de los Gm que se muestran en la figura.

1.3 Ensayo de citotoxicidad

Debido a la disminución de MHC de clase I observada en las células HeLa tratadas con SLPIrh, se decidió, estudiar si este tratamiento volvería a estas células epiteliales de origen tumoral más susceptibles al ataque citotóxico por parte de las células Natural Killer. Para esto, células NK fueron aisladas, purificadas a partir de sangre periférica de dadores sanos y enfrentadas con células HeLa tratadas o no con SLPIrh.

Como puede verse en la **Tabla 2**, a pesar que éstas células NK fueron capaces de lisar a las células C1R (control positivo del ensayo), el tratamiento de las células HeLa con SLPI no modificó la citotoxicidad basal de las NK sobre la monocapa de células HeLa.

GRUPOS	% DE CITOTOXICIDAD
NK	1,1 ± 1
HeLa + NK	20,7 ± 4,6
HeLa + SLPIrh + NK	19,5 ± 5
C1R + NK	31,7 ± 4,3

Tabla 2. Citotoxicidad observada en células HeLa tratadas con SLPIrh en presencia de células NK. Células HeLa tratadas durante 18 hs con SLPIrh fueron puestas en contacto con células NK en relación 5:1(NK:HeLa) durante 4 hs; luego la citotoxicidad fue medida utilizando el kit comercial no radiactivo *Cyto Tox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega, Madison, WI, USA). Los resultados se muestran como la Media ± SD de un experimento representativo de dos. Las células C1R se utilizaron como control positivo del ensayo.

2. EFECTO DEL SLPI SOBRE MONOCITOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS

Hasta aquí, el efecto del SLPI había sido evaluado sobre células epiteliales. Para estudiar un posible efecto del SLPI también sobre células del sistema inmune, decidimos estudiar la posible variación de la expresión de moléculas de superficie sobre monocitos y células dendríticas (CDs) luego del agregado exógeno de SLPIrh.

2.1 Monocitos

Se analizó la posible variación en la expresión de distintas moléculas de superficie (CD54, CD14, MHC I, MHC II, CD86 y CD18) sobre monocitos obtenidos de sangre periférica de dadores sanos al ser tratados con SLPIrh. Estas determinaciones se hicieron por inmunomarcación directa cuantificando la fluorescencia por citometría de flujo. Los monocitos fueron obtenidos y expuestos a SLPIrh (4 µg/ml) o buffer durante 18 horas como está indicado de forma detallada en Materiales y Métodos. Analizadas las inmunomarcaciones se pudo observar que el SLPI disminuyó levemente la expresión de CD14, y MHC II en los monocitos; mientras que no se observaron diferencias en la expresión de CD54 y MHC I (**Figura 17**). Las moléculas de superficie CD18 y CD86 tampoco presentaron diferencias en su expresión (datos no mostrados).

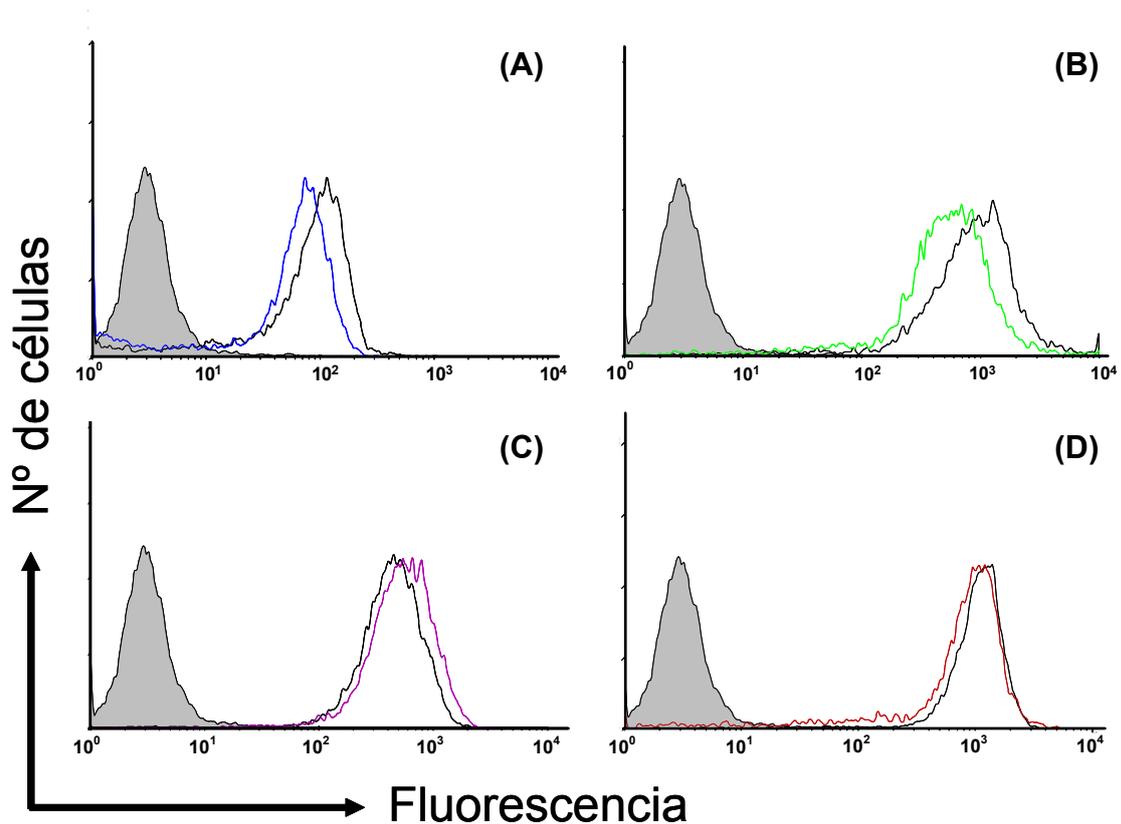


Figura 17. Expresión de CD14 (A), MHC de clase II (B), MHC de clase I (C) y CD54 (D) en monocitos tratados o no con SLPIrh. Monocitos sin tratar (histogramas negros) o tratados con SLPIrh (4 $\mu\text{g/ml}$) durante 18 hs (histogramas de color según el caso) fueron marcados con anticuerpos monoclonales fluorescentes anti-CD14 (A) o anti-HLA - DR, DP, DQ (B) o anti-HLA - A, B, C (C) o anti-CD54 (D). Se muestran los resultados obtenidos en un experimento representativo de tres experimentos independientes. El control de isotipo se muestra en gris y fue similar para ambos grupos en todos los casos.

2.2 Células dendríticas

El siguiente paso fue analizar la expresión de moléculas de MHC de clase I y II en la superficie de CDs generadas a partir de monocitos. Una vez generadas las CDs como se describe en Materiales y Métodos, éstas fueron expuestas a SLPIrh (4 $\mu\text{g/ml}$) o buffer durante 18 horas. En la **Figura 18** se observa que, en las CDs tratadas con SLPI y contrariamente a lo observado en monocitos, existe una disminución en la expresión de MHC de clase I, pero no de MHC de clase II (dato no mostrado).

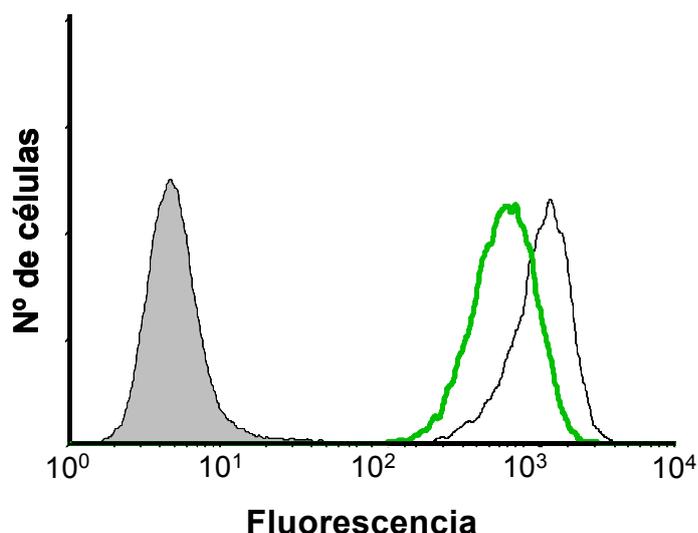


Figura 18. Expresión de MHC I en células dendríticas tratadas con SLPIrh. CDs sin tratar (histograma negro) o tratadas con SLPIrh (4 μ g/ml) (histograma verde) durante 18 hs fueron marcadas con un anticuerpo monoclonal fluorescente anti-HLA - A, B, C. Se muestran los resultados obtenidos en un experimento representativo de tres experimentos independientes. El control de isotipo se muestra en gris y fue similar para ambos grupos

3. EFECTO DEL SLPI EN LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA

También se analizó un posible efecto del SLPI sobre los linfocitos. En este caso, en lugar de analizar la expresión de moléculas de superficie, se evaluó la capacidad de proliferación linfocitaria en respuesta a mitógenos.

Para ello se utilizó como mitógeno un anticuerpo anti-CD3 (OKT3), el cual, al unirse al complejo receptor TCR, dispara una cascada de transducción de señales que desencadena en la transcripción de genes proinflamatorios. Para esto, células mononucleares de sangre periférica fueron colocadas en microplacas de cultivo y tratadas con anticuerpo anti-CD3 (OKT3). El experimento fue llevado a cabo como se describe en la sección Materiales y Métodos. Como puede observarse en la **Figura 19 (A)**, el agregado de SLPIrh, inhibió significativamente la proliferación de los linfocitos estimulados con el anticuerpo OKT3.

También se estudió el efecto del SLPIrh sobre la proliferación linfocitaria en otro modelo. En éste, las células mononucleares fueron cultivadas con IL-2 (8 ng/ml) en presencia o ausencia de SLPIrh y, como puede observarse en la **Figura 19 (B)**, el agregado de SLPIrh también disminuyó significativamente la proliferación de los linfocitos.

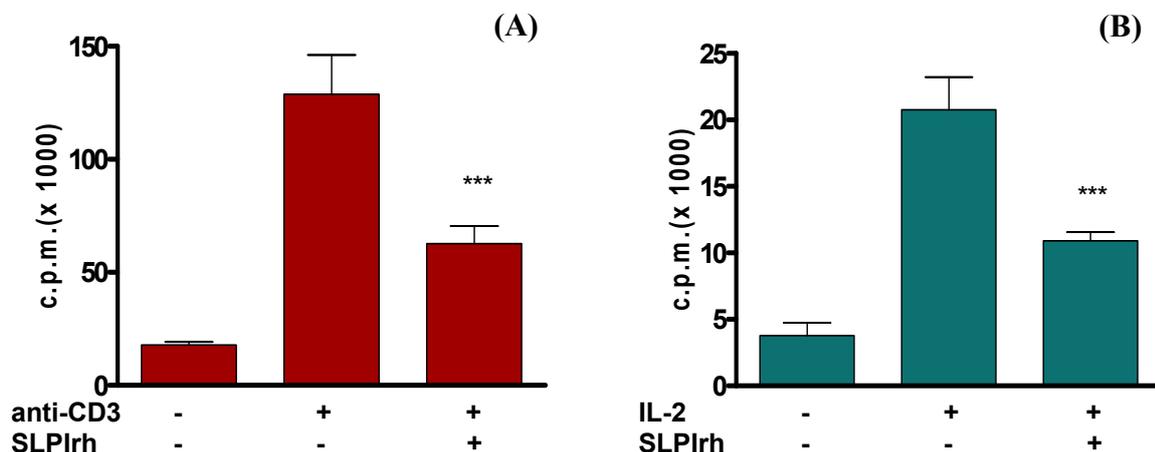


Figura 19. Efecto del SLPIrh sobre la proliferación linfocitaria. Células mononucleares obtenidas a partir de dadores sanos fueron estimuladas con anticuerpo anti-CD3 (OKT3) **(A)** o IL-2 (8 ng/ml) **(B)** y simultáneamente tratadas o no con SLPIrh (4 µg/ml). Se incubaron durante cinco días y la proliferación celular se midió por incorporación de timidina tritiada. En ambos casos, los datos se expresan como la media \pm ESM de cuatro experimentos diferentes. *** $p < 0,001$ (ANOVA, Dunnet para comparaciones múltiples)

En base a los efectos observados del SLPI sobre las células epiteliales de origen tumoral, se sugirió un posible rol del mismo como un factor involucrado en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral. Esta hipótesis se sustentaba en los siguientes resultados: i) baja inmunogenicidad, por disminución de MHC de clase I y carencia de susceptibilidad al ataque citotóxico por las células NK, ii) disminución de CD54 lo que impediría una correcta interacción célula-célula la cual depende en parte, de la interacción de esta molécula con LFA-1 presente sobre los leucocitos; iii) disminución de la expresión de CD29 en las células tumorales, lo que también hacía suponer que la producción de SLPI podría estar relacionada con un aumento en la capacidad metastásica de las células productoras de esta proteína y iv) presencia de factores inmunosupresores, avalada por la inhibición de la proliferación de linfocitos estimulados tanto con IL-2 como con anticuerpo anti-CD3.

Todos estos efectos nos hicieron pensar que el SLPI podría cumplir un rol en la progresión tumoral y en la metástasis.

4. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN *IN VIVO* DE CÉLULAS F3II SOBREPDUCTORAS DE SLPI

4.1 Producción y caracterización de las células F3II sobreproductoras de SLPIh

Para examinar la hipótesis planteada en la sección anterior, sobre un rol del SLPI en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral, se decidió generar células tumorales murinas productoras de SLPI humano, las cuales serían utilizadas en modelos *in vivo*.

Dado que la idea era la generación de clones murinos productores de SLPI humano, previo a la generación de los mismos, y a pesar de la existencia de datos sobre efectos del SLPI humano en modelos murinos^{159,162,178}, estudiamos la capacidad del SLPIh para inhibir la proliferación de esplenocitos murinos *in vitro*. Una vez obtenidos los esplenocitos, tal como se describe en Materiales y Métodos, se procedió a realizar un ensayo de proliferación celular inducida por un mitógeno (Concanavalina A) en presencia o ausencia de SLPIrh.

En la **Figura 20** se observa que el SLPI recombinante humano inhibió la proliferación de los esplenocitos murinos de forma similar a lo que se había observado en células mononucleares humanas de sangre periférica (**Figura 19**), corroborando que las células murinas responden al SLPI humano.

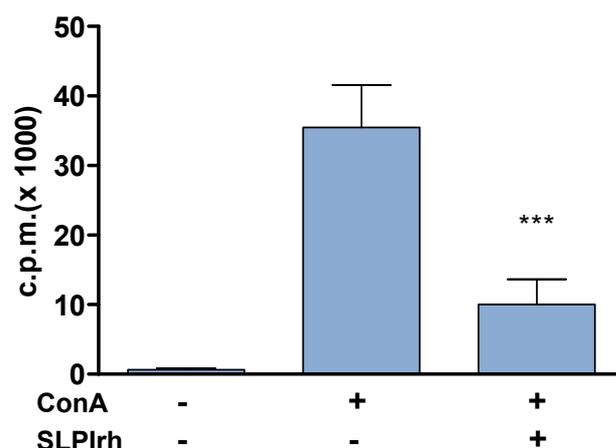


Figura 20. Efecto del SLPIrh sobre la proliferación de esplenocitos murinos. Células obtenidas a partir del bazo de ratones hembra BALB/c fueron estimuladas con ConA (2 µg/ml) y simultáneamente tratadas o no con SLPIrh (4 µg/ml). Se incubaron durante cinco días y la proliferación celular se midió por incorporación de timidina tritiada. Los datos se expresan como la media ± ESM de tres experimentos diferentes. *** $p < 0,001$ (ANOVA, Dunnet para comparaciones múltiples)

Luego de esto, se generaron células F3II productoras de SLPIh por transfección estable con el plásmido pcDNA3 conteniendo el gen para dicha proteína. Como ya se mencionó, la línea celular F3II proviene de un carcinoma mamario murino sarcomatoide y fue establecida a partir de un clon de un tumor mamario murino espontáneo y hormono-independiente de la cepa BALB/c, la misma está descrita como una variante altamente invasiva y metastásica¹⁷³.

Luego de la transfección, se aislaron dos clones productores de SLPIh: el clon 2C1 y el clon B3. Al evaluar la producción de SLPI humano por parte de los mismos, se observó que el clon 2C1 producía cantidades mayores que el clon B3 (**Figura 21A**).

Otros parámetros estudiados sobre los clones productores de SLPIh, previo a la administración de estas células a ratones, fueron: i) la tasa de proliferación basal, ii) la apoptosis basal y iii) la expresión de moléculas de superficie.

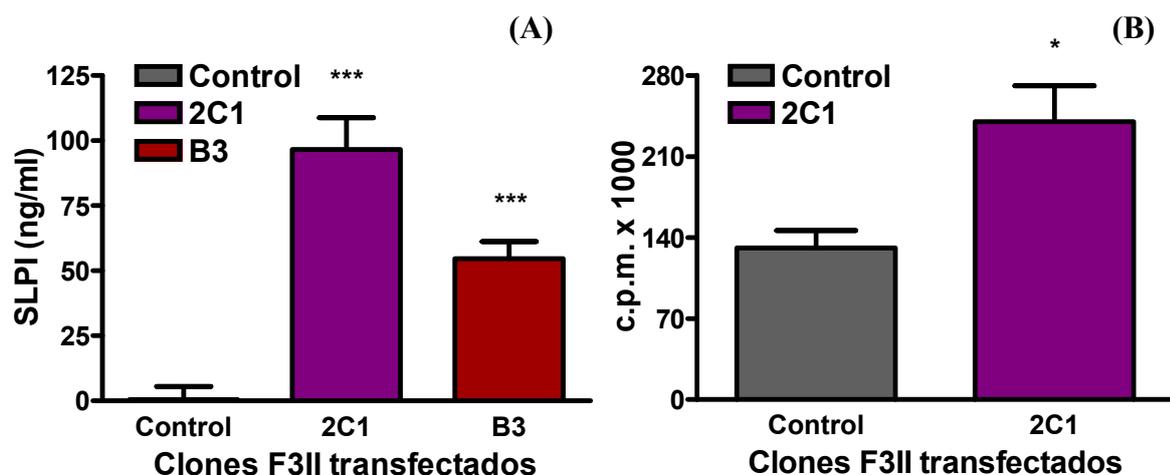


Figura 21. (A) Niveles de SLPIh producidos por los clones. Los clones transfectados con el pcDNA3 con el gen del SLPIh o su control fueron incubados durante 96 hs en estufa gaseada a 37°C y se evaluaron los niveles de producción de SLPIh en el sobrenadante con un ensayo de sándwich ELISA para SLPIh. (***) $p < 0,001$ 2C1 vs Control; (***) $p < 0,001$ B3 vs Control. (*Test t de Student para datos apareados*). Se muestra la Media \pm SD de un experimento representativo de cinco. **(B) Proliferación de los clones transfectados.** El clon 2C1 y su control fueron sembrados en placas de 96 pocillos y fueron incubados por 24 horas a 37°C. Luego las células fueron incubadas con 5 μ Ci/ml de (metil- 3 H) timidina por 18 hs. Finalmente, las células fueron cosechadas y fue medida la incorporación de radioactividad en un contador de centelleo líquido β . Los datos se expresan como la Media \pm ESM de tres experimentos diferentes. * $p < 0,05$. (*Test t de Student para datos apareados*).

La **Figura 21B** muestra que el clon 2C1 presentó una tasa de proliferación significativamente mayor que las células controles. Por otro lado, al estudiar la presencia de apoptosis basal por citometría de flujo sobre los clones, no se observaron diferencias significativas entre éstos y las células control (datos no mostrados), lo que demostró que la sobreexpresión de SLPIh no afectaba a la viabilidad de las células F3II.

Como ya se mencionó, también se estudiaron modificaciones en la expresión de moléculas de superficie en los clones obtenidos. En particular se analizó por citometría de flujo la expresión de CD29 murino y de MHC de clase I H2-D. En la **Figura 22**, se observa que el clon 2C1, presentó una pequeña disminución en la expresión de MHC I y una disminución prácticamente total de CD29.

Para el caso del clon B3 (productor moderado de SLPIh) no se observaron diferencias en cuanto a la expresión de MHC I, mientras que pudo observarse una leve disminución en la expresión de CD29 al compararse frente a las células control (datos no mostrados).

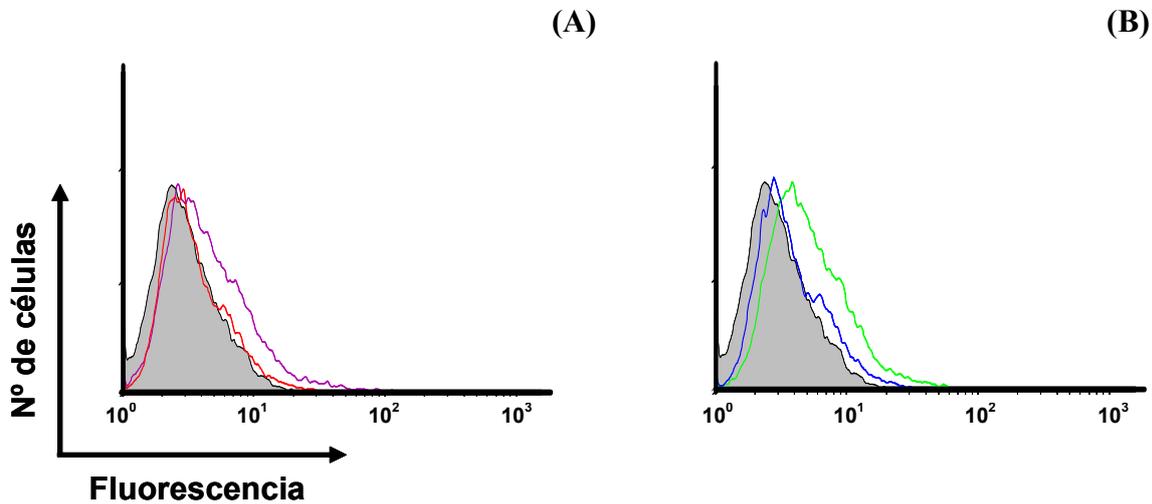


Figura 22. Expresión de MHC I H2-D (A) y CD29 (B) en células F3II transfectadas. Células F3II control (transfectadas con el plásmido vacío – histograma violeta en **A** y verde en **B**) o del clon productor de cantidades elevadas de SLPIh (clon 2C1 – histograma rojo en **A** y azul en **B**) fueron marcadas con anticuerpos monoclonales fluorescentes anti-MHC I H2-D (**A**) o anti-CD29 murino (**B**). Se muestran los resultados obtenidos en un experimento representativo de tres experimentos independientes. El control de isotipo se muestra en gris y fue similar para ambos grupos.

Estos resultados obtenidos con los clones murinos productores de SLPI humano concuerdan con los mostrados en el Capítulo 1 de esta sección sobre las células HeLa transfectadas con SLPIh (clon 3A) o tratadas con SLPIrh agregado de forma exógena (**Figuras 10, 14 y 16**).

4.2 Efecto de la administración de células tumorales productoras de SLPIh en ratones inmunocompetentes

Para estudiar el desarrollo tumoral de estas células productoras de SLPIh en un modelo *in vivo*, se inocularon los clones productores de SLPIh en ratones inmunocompetentes (BALB/c). Los animales fueron tratados con 8×10^5 células de forma subcutánea (s.c.) en su flanco izquierdo.

Sorpresivamente, y a pesar de la hipótesis planteada, sustentada en los datos obtenidos *in vitro*, cuando las células 2C1 (sobreproductoras de altos niveles de SLPIh) fueron inoculadas en estos animales, ninguno desarrolló tumor a lo largo de los 80 días de evaluación (**Figura 23A**) y todos sobrevivieron* hasta la finalización del experimento (**Figura 23B**). Por otro lado, todos los animales inoculados con el clon B3 (bajo productor de SLPIh) desarrollaron tumores, pero con un período de latencia más largo y con un volumen tumoral menor que los controles (**Figura 23A**). Además, a diferencia del grupo control, la mayoría de los animales inoculados con B3, no alcanzaron, hasta el final del experimento, el volumen límite como para ser sacrificados (**Figura 23B**).

Cuando estos animales fueron analizados para investigar la presencia de metástasis pulmonares se observó que los animales control tenían múltiples focos metastásicos, mientras que los animales tratados con los clones 2C1 o B3 estaban completamente libres de metástasis (datos no mostrados).

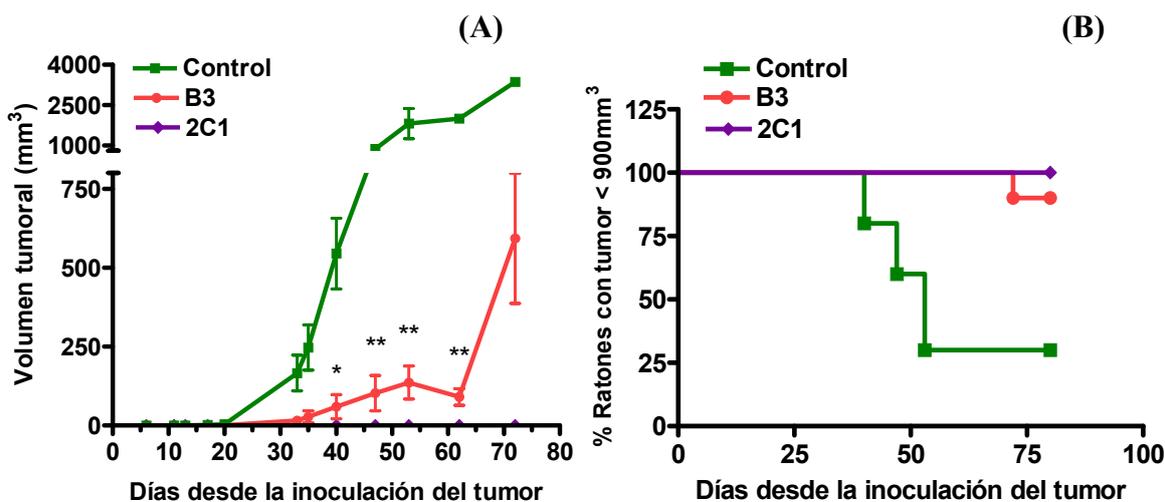


Figura 23. Efecto de la inoculación de células productoras de SLPIh en ratones inmunocompetentes (BALB/c). **A:** Ratones BALB/c fueron inoculados por vía s.c. con los clones 2C1, B3 o control (8×10^5 células por ratón) y fue evaluado el crecimiento tumoral. Se muestra la Media \pm SD de un experimento representativo de cinco. Cada grupo contiene diez animales. El crecimiento tumoral fue monitoreado por setenta y dos días. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ B3 vs Control. (*Test t de Student para datos no apareados*). **B:** Gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier para los ratones de (A). Por razones éticas los animales fueron sacrificados al alcanzar volúmenes tumorales de 900 mm^3 .

* Durante la presente tesis se denominarán experimentos de supervivencia a aquellos en los cuales los ratones fueron sacrificados cuando el volumen del tumor que portaban superaba un límite por encima del cual se consideraba como no ético seguir el experimento.

Estos resultados mostraron que el SLPI tenía un claro efecto antitumoral y que la concentración de SLPI dentro del tumor parecía ser un factor crítico para que el efecto se manifestara plenamente.

4.3 Estudio de la participación de la respuesta inmune sobre el efecto antitumoral del SLPI

Con el objeto de evaluar la participación del sistema inmune en el efecto antitumoral de SLPI, experimentos similares fueron realizados empleando ratones atímicos (Nude). Estos ratones fueron inoculados por vía s.c. con 5×10^6 células de los clones 2C1, B3 o células controles. En este caso, todos los ratones Nude desarrollaron tumor independientemente de las células tumorales administradas (**Figura 24A**). Sin embargo, el crecimiento tumoral inducido por los clones 2C1, pero no por los clones B3, fue significativamente menor que con las células controles. Además, a diferencia de los animales controles y los inoculados con el clon B3, todos los animales inoculados con los clones 2C1 llegaron al final del experimento con un volumen tumoral inferior al límite necesario para ser sacrificados (**Figura 24B**).

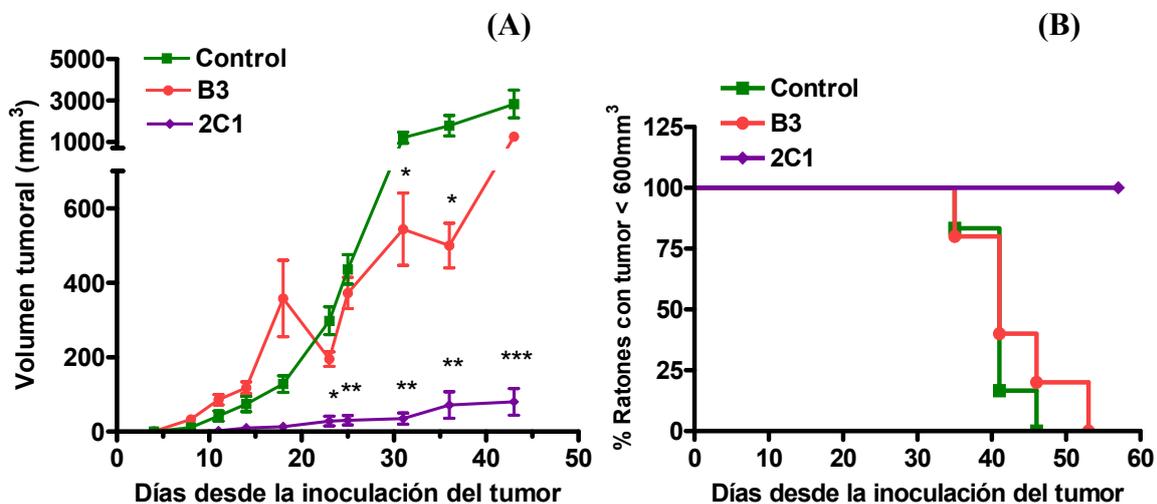


Figura 24. Efecto de la inoculación de clones productores de SLPIh en ratones inmunodeficientes (atímicos). **A:** Ratones Nude fueron inoculados por vía s.c. con los clones 2C1, B3 o control (5×10^6 células por ratón) y fue evaluado el crecimiento tumoral. Se muestra la Media \pm SD de un experimento representativo de tres. Cada grupo contiene cinco animales. El crecimiento tumoral fue monitoreado por cuarenta y tres días. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ 2C1 y B3 vs Control. (Test *t* de Student para datos no apareados). **B:** Gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier para los ratones de (A). Por razones éticas los animales fueron sacrificados al alcanzar volúmenes tumorales de 600 mm^3 .

Este resultado fue diferente del obtenido en ratones BALB/c y nos sugirió que la respuesta inmune adaptativa estaría, al menos, parcialmente involucrada en el mecanismo de rechazo tumoral mediado por SLPI.

Una de las principales características de la respuesta inmune adaptativa es la generación de memoria inmunológica. Para analizar la presencia de dicha memoria, se inocularon células F3II (que siempre desarrollan tumor) a ratones BALB/c que previamente habían recibido 5×10^6 células del clon 2C1 y que no habían desarrollado tumor (ratones sensibilizados). La **Figura 25** muestra que estos animales al ser inoculados con 8×10^5 células de F3II desarrollaron tumores con un período de latencia similar al de los controles; pero alcanzaron volúmenes significativamente inferiores. Esto sugiere que existe cierta memoria inmunológica que es capaz de retardar el crecimiento del tumor pero que no alcanza a eliminarlo.

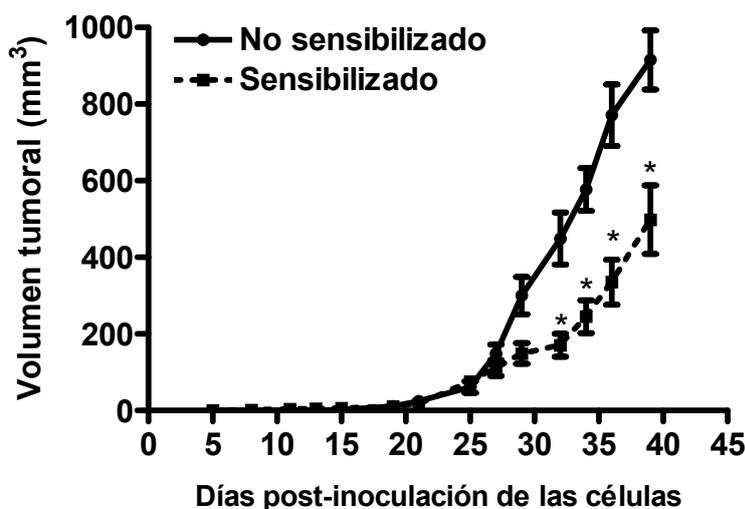


Figura 25. Crecimiento tumoral en ratones sensibilizados previamente con el clon 2C1. Ratones BALB/c que habían sido inoculados con 5×10^6 células del clon 2C1 y no habían desarrollado tumor fueron re-inoculados con 8×10^5 células F3II control. El tiempo transcurrido entre la inoculación de las células del clon 2C1 y las F3II fue de 2 meses. Se muestra la Media \pm SD de un experimento representativo de 3 utilizando 5 animales por grupo. * $p < 0,05$ (Test *t* de Student para datos no apareados).

Como se observó en la **Figura 24**, en los ratones Nude el tamaño del tumor inducido por la administración del clon 2C1 no alcanzó el tamaño tumoral inducido por las

células controles a todos los tiempos analizados, sugiriendo también la participación de la respuesta inmune innata en la respuesta antitumoral del SLPI.

Por otro lado, dada la disminución en la expresión de MHC de clase I que habíamos observado sobre las células tumorales HeLa y F3II, ya sea por tratamiento con SLPIrh o por la sobreproducción de dicha proteína, hipotetizamos que el SLPI podría presentar al menos parte de los efectos antitumorales por transformación de las células epiteliales en células más susceptibles a la acción citocida de las células NK.

Para estudiar esto, evaluamos en primera instancia el crecimiento tumoral en ratones inmunocompetentes (BALB/c) depletados de células NK utilizando el anticuerpo anti-asialo GM1¹⁷⁷. Como se muestra en la **Figura 26A**, la inoculación de células control (F3II transfectadas con el plásmido vacío) generó tumores mayores en los animales depletados de células NK comparados con los animales no depletados. Este resultado sugiere que las células NK controlan el crecimiento tumoral inducido por la administración de las células F3II transfectadas con el plásmido vacío. Sin embargo, la inoculación del clon 2C1 a ratones BALB/c depletados de células NK no generó tampoco la aparición de tumores, indicando que las células NK no juegan un rol en la respuesta antitumoral contra las células productoras de SLPI (2C1). Incluso, podría llegar a postularse un posible efecto inhibitor de los clones 2C1 sobre las células NK.

En un intento por dilucidar que otras células de la respuesta inmune innata podrían estar involucradas en el rechazo de las células tumorales productoras de SLPIh, analizamos la participación de los neutrófilos (PMN). Los PMN son células efectoras de la respuesta inmune innata y los mismos han sido involucrados en ciertos mecanismos anti-tumorales^{50,72-78}. Más aún, en nuestro modelo, el análisis histológico del sitio de inoculación con 2C1 reveló la presencia de un pronunciado infiltrado de neutrófilos (datos no mostrados). Así, ratones BALB/c fueron depletados de neutrófilos usando el anticuerpo monoclonal RB6-8C5. El grado de depleción fue mayor del 75% en ambos casos (datos no mostrados). La **Figura 26B** muestra que la inoculación de 8×10^5 células en ratones inmunocompetentes depletados de neutrófilos permitió el crecimiento del tumor en todos los animales inoculados con el clon 2C1; hecho que nunca se observó en

animales inmunocompetentes o depletados de células NK. Estos resultados sugirieron que los neutrófilos jugarían un rol importante en el efecto antitumoral de SLPIrh. Sin embargo, aún los animales depletados de neutrófilos inoculados con el clon 2C1 sobrevivieron hasta la finalización del experimento (dato no mostrado).

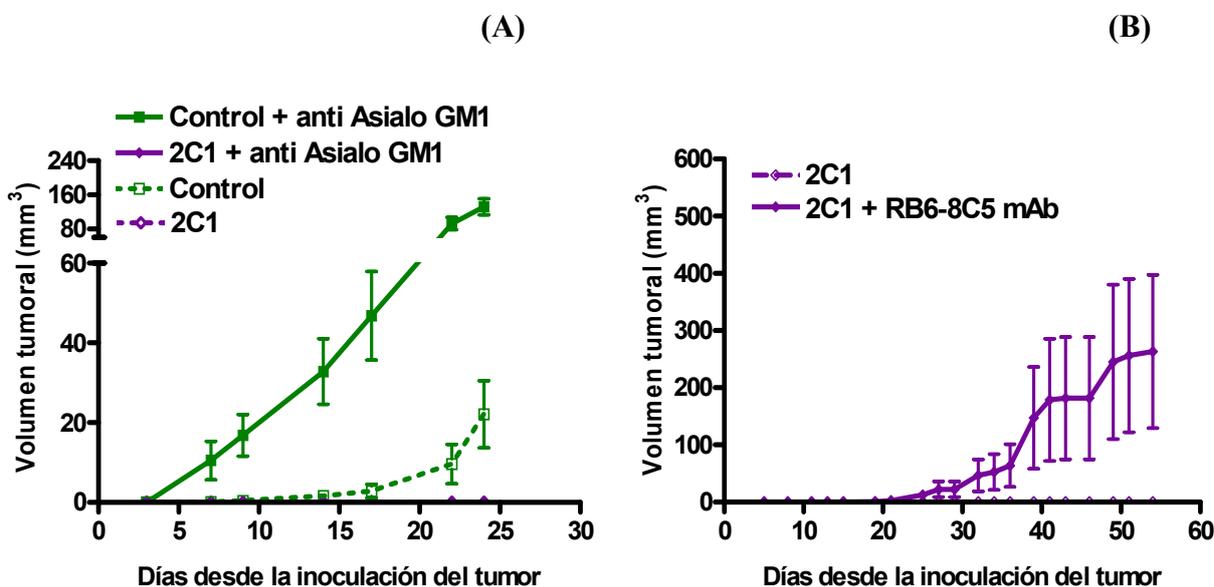


Figura 26. Efecto de la depleción de células NK o neutrófilos (PMN) en el crecimiento tumoral en ratones inmunocompetentes. **A:** Ratones BALB/c fueron depletados de células NK por inyección i.p. del anticuerpo de conejo anti-asialo GM1 como se describe en Materiales y Métodos. Los ratones fueron inoculados con 8×10^5 células 2C1 (\diamond) o células control (\square) y tratados con el anticuerpo (símbolo lleno) o sin él (símbolo vacío). El crecimiento tumoral fue monitoreado por veinticuatro días. Cada grupo contiene ocho animales. Se muestra la Media \pm SD de un experimento representativo de dos. **B:** Ratones BALB/c fueron depletados de neutrófilos (PMN) por inyección i.p. del anticuerpo monoclonal RB6-8C5 como se describe en Materiales y Métodos. Los ratones fueron inoculados con 8×10^5 células 2C1 y tratados con el anticuerpo monoclonal RB6-8C5 (\blacklozenge) o sin él (\lozenge). Se muestra la Media \pm SD de un experimento representativo de tres, usando cinco animales por grupo. El crecimiento tumoral fue monitoreado por cincuenta y cuatro días.

Con el objeto de confirmar el rol de los neutrófilos y de la respuesta inmune adaptativa en el efecto antitumoral, ratones Nude fueron depletados de neutrófilos. La **Figura 27** muestra que todos los ratones Nude inoculados con el clon 2C1 desarrollaron tumor, algo que ya habíamos observado con anterioridad (**Figura 24**). Sin embargo, la depleción de neutrófilos en ratones Nude condujo a un mayor crecimiento tumoral comparado al observado con los ratones no depletados, sugiriendo un rol fundamental de los neutrófilos en el mecanismo antitumoral inducido por las células tumorales productoras de SLPI, incluso en los ratones atímicos.

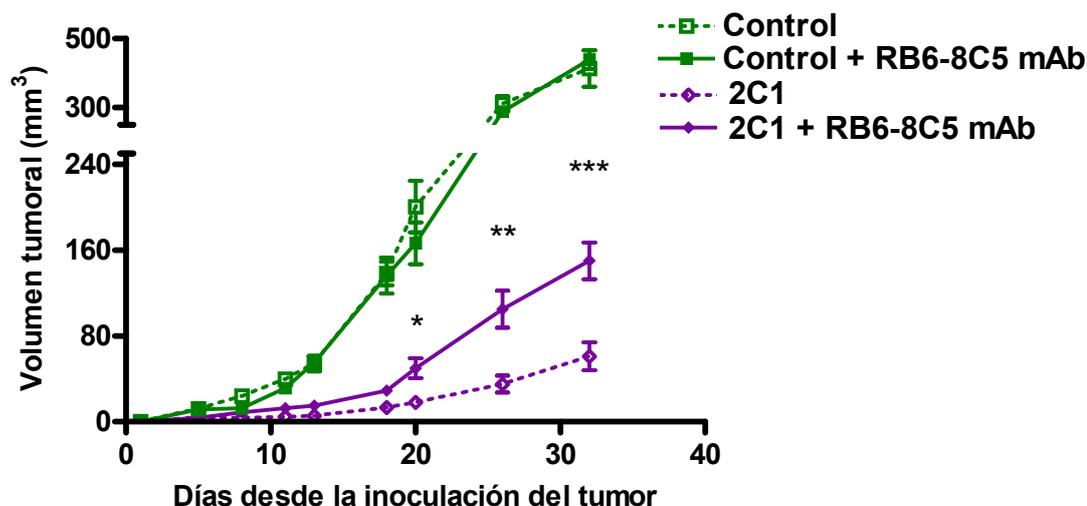


Figura 27. Efecto de la depleción de neutrófilos (PMN) en el crecimiento tumoral en ratones atímicos (Nude). Ratones Nude fueron depletados de neutrófilos por inyección i.p. del anticuerpo monoclonal RB6-8C5 como se describe en Materiales y Métodos. Los ratones fueron inoculados con 5×10^6 células 2C1 (\diamond) o células control (\square) y tratados con el anticuerpo (línea llena) o sin él (línea punteada). El crecimiento tumoral fue monitoreado por treinta y dos días. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$ 2C1 vs. 2C1 + RB6-8C5 mAb. (Test *t* de Student para datos no apareados). Se muestra la Media \pm SD de un experimento representativo de dos con similares resultados usando cinco animales por grupo.

Tomando en consideración estos resultados, pudimos concluir que los neutrófilos participan en el mecanismo de rechazo de las células tumorales que producen altos niveles de SLPI. Como pudimos observar, en ratones Nude, este efecto no fue completamente revertido indicando que la participación de los neutrófilos y las células de la respuesta inmune adaptativa podrían no ser el único factor involucrado en la respuesta.

4.4. Análisis del plasma de ratones inoculados con células sobreproductoras de SLPI

Tomando en consideración que la inhibición del crecimiento tumoral no fue completamente revertida por la depleción de los neutrófilos en los ratones Nude, se investigó un mecanismo alternativo o sinérgico para la inhibición del crecimiento tumoral. De esta manera, hipotetizamos que los animales inoculados con el clon 2C1, pero no los controles, podrían estar induciendo factores apoptóticos que mediarían el

efecto antitumoral de los clones productores de SLPIh. Más aún, los posibles factores apoptóticos deberían estar presentes en el plasma de los ratones que no desarrollan tumor, es decir, aquellos que reciben el clon 2C1. Con el objeto de evaluar esta hipótesis, se obtuvo el plasma de los ratones inoculados con el clon 2C1 a las 24 horas y a los 7 días post-inoculación. Luego, células 2C1 fueron incubadas con los plasmas recolectados y los niveles de apoptosis fueron determinados por citometría de flujo marcando a las células con Ioduro de Propidio y Anexina-V FITC. En la **Figura 28A** se puede observar que el plasma obtenido a las 24 hs. post-inoculación del clon 2C1 induce una mayor apoptosis que el plasma obtenido de los animales controles (ratones no inoculados). Sin embargo, se observó un efecto aún más pronunciado con el plasma de los animales obtenidos 7 días post-inoculación de los clones 2C1 (**Figura 28B**).

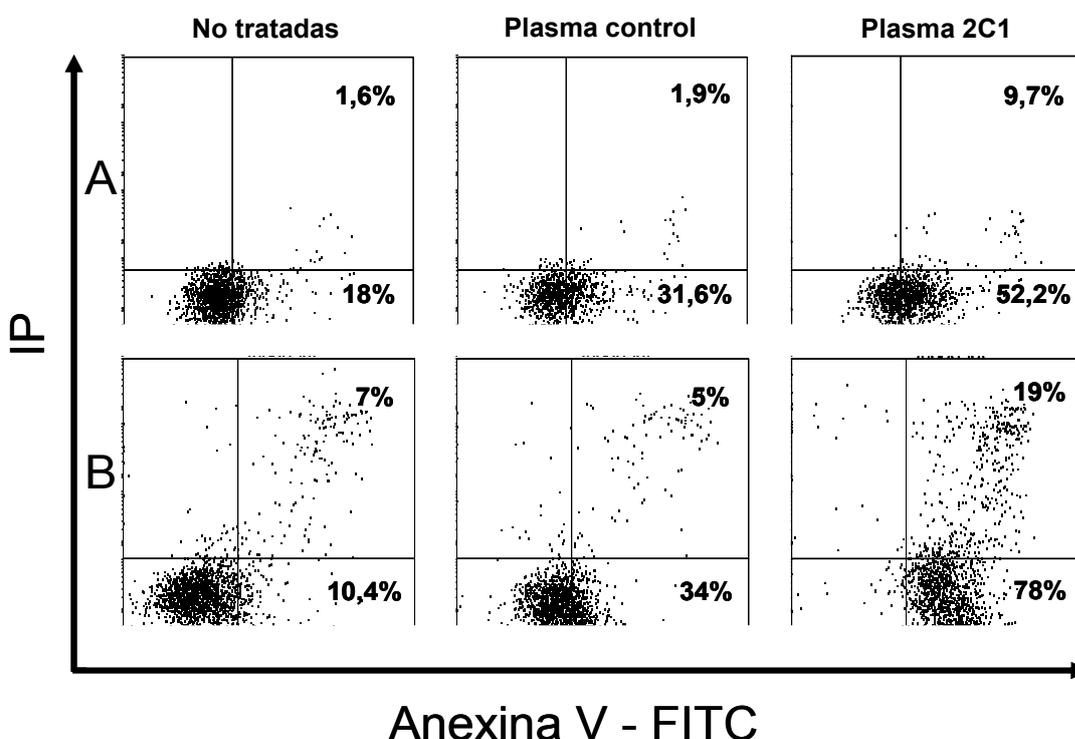


Figura 28. Estudio de apoptosis sobre células 2C1 tratadas con plasma de animales inoculados o no con células tumorales. Ratones BALB/c fueron inoculados con 8×10^5 células 2C1 y 24 horas (**A**) o siete días (**B**) más tarde el plasma fue extraído. Treinta y tres por ciento de plasma de los ratones no inoculados o inoculados con células 2C1 fue cultivado con 9×10^5 células 2C1 *in vitro*. Luego las células fueron cosechadas con EDTA 0,04 % y la apoptosis fue medida usando, para las marcaciones un kit comercial (*Apoptosis Detection Kit I*, BD Biosciences, USA), y un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson-BD, USA). Se muestra un experimento representativo de tres con similares resultados.

Teniendo en cuenta estos resultados, pudimos confirmar de esta forma la presencia de uno o más potentes factores apoptóticos en el plasma de los ratones que rechazan el tumor (inoculados con las células del clon 2C1) sugiriendo que la completa inhibición del crecimiento de las células 2C1 en los ratones inmunocompetentes podría ser debida, no sólo a la participación de las células de la respuesta inmune, sino también al efecto de factores apoptóticos presentes en el plasma, derivados o no de células de la respuesta inmune adaptativa y/o innata. Actualmente estamos llevando a cabo experimentos tendientes a determinar si estos factores pro-apoptóticos derivan de los PMN y si son capaces de inducir también la apoptosis de las células F3II.

5. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL SLPI EXÓGENO

Para probar si el efecto antitumoral del SLPI producido por las células tumorales era también observado con SLPIrh agregado de forma exógena en el sitio del crecimiento del tumor, ratones hembra adultos BALB/c fueron inoculados con 8×10^5 células F3II de forma subcutánea en su flanco izquierdo y el efecto de SLPI sobre el crecimiento tumoral fue evaluado tras la administración de la proteína empleando diferentes vías de inoculación.

Así, en el día 0 un grupo de ratones recibió, junto con las células tumorales, una inyección de SLPIrh en forma intraperitoneal (i.p.) (**Figura 29A**), en tanto otro grupo de ratones recibió la proteína por vía s.c., en la zona de inoculación de las células tumorales (**Figura 29B**). Las inyecciones de SLPIrh se repitieron, en ambos casos, a lo largo del experimento cada dos o tres días. La **Figura 29A** muestra que la administración i.p. de SLPIrh (40 $\mu\text{g/ml}$) no modificó la velocidad de crecimiento del tumor; pero, por el contrario, la **Figura 29B** muestra que la inyección s.c. de SLPIrh (4 $\mu\text{g/ml}$) en el sitio de inoculación de las células tumorales hizo que se desarrollen tumores significativamente menores que los controles y aumentó la sobrevida de los ratones (**Figura 30**). Es interesante notar también que el período de latencia fue menor en los animales controles comparados con los ratones que recibieron SLPIrh de forma s.c.

El siguiente paso fue determinar si el efecto antitumoral del SLPI dependía de su actividad anti-proteasa. Para lo cual, se repitieron los experimentos descritos más arriba utilizando SLPIrh desnaturalizado por tratamiento a pH ácido.

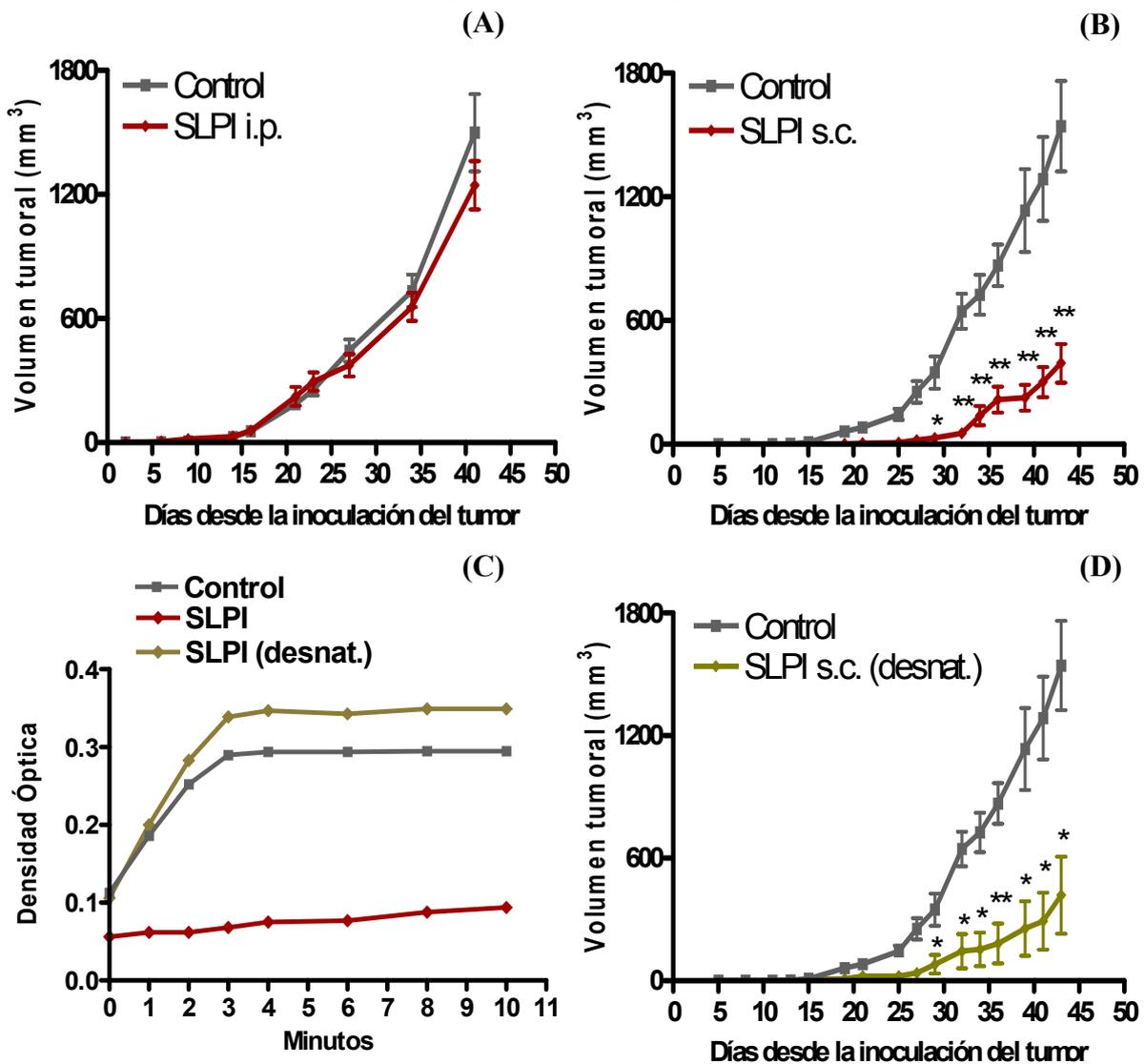


Figura 29. Efecto de la administración exógena de SLPIrh sobre el crecimiento tumoral. Ratones BALB/c fueron inoculados por vía s.c. en su flanco izquierdo con 8×10^5 células F3II y tratados con: 40 $\mu\text{g/ml}$ de SLPIrh por vía i.p. (A), 4 $\mu\text{g/ml}$ SLPIrh por vía s.c. (B) o 4 $\mu\text{g/ml}$ SLPIrh desnaturalizado por vía s.c. (D). El crecimiento tumoral fue monitoreado por cuarenta y tres días para A, B y D. Se muestra la Media \pm SD de un experimento representativo de tres para A y D y cuatro para B con resultados similares. Cada grupo contiene cinco animales para A y D y diez animales para B. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Test *t* de Student para datos no apareados). C: Ensayo de actividad anti-tripsina del SLPIrh nativo y del desnaturalizado por pH ácido que se utilizó en los experimentos *in vivo*.

La desnaturalización fue confirmada por el ensayo de inhibición de tripsina descrito en Materiales y Métodos (**Figura 29C**). La **Figura 29D** muestra que la administración s.c. de SLPIrh desnaturalizado fue capaz de disminuir el crecimiento del tumor y aumentar la sobrevida de los ratones (**Figura 30**) prácticamente en la misma medida que el SLPIrh no desnaturalizado. Estos resultados indicaron que la actividad antitumoral del SLPIrh sobre las células de carcinoma mamario F3II no es dependiente de su actividad anti-proteasa.

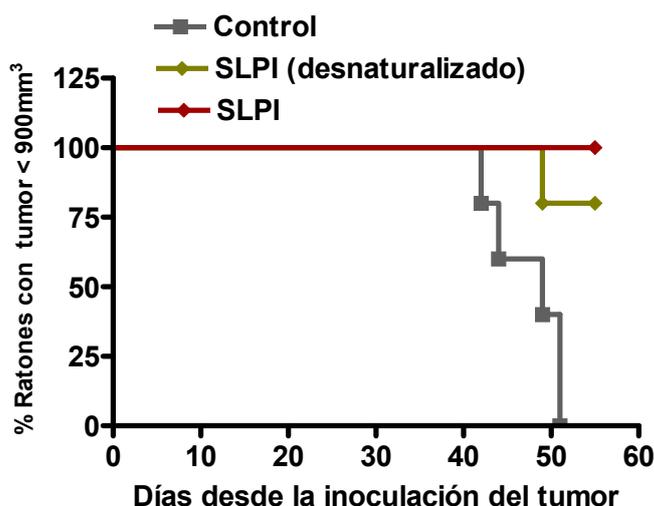


Figura 30. Gráfico de sobrevida de Kaplan-Meier para los ratones inoculados con células F3II y tratados con SLPIrh. Se muestra el % de sobrevida de los ratones BALB/c portadores de tumor, tratados con buffer de dilución del SLPIrh (control), o con SLPIrh o con SLPIrh desnaturalizado por pH ácido (4 $\mu\text{g/ml}$ en ambos casos). Para el cálculo del % de sobrevida y por cuestiones éticas, los animales fueron sacrificados al alcanzar volúmenes tumorales mayores a 900 mm^3 .

Uno de los posibles mecanismos antitumorales del SLPI sobre las células malignas F3II podría ser la inducción de apoptosis de las mismas. Con el objeto de determinar si la inhibición del crecimiento tumoral y el aumento de sobrevida de los animales podría ser debido a un efecto apoptótico directo de SLPIrh sobre las células tumorales, células F3II se cultivaron en presencia de SLPIrh o SLPIrh desnaturalizado por pH ácido y la apoptosis sobre estas células fue evaluada por citometría de flujo, usando ioduro de propidio y Anexina V-FITC.

En la **Figura 32** puede observarse la ausencia de un efecto directo pro-apoptótico tanto por parte del SLPIrh como del SLPIrh desnaturalizado. Estos resultados implican que el

efecto antitumoral del SLPIrh no es un efecto directo sobre las células F3II y sugeriría una posible participación del sistema inmune en el mismo.

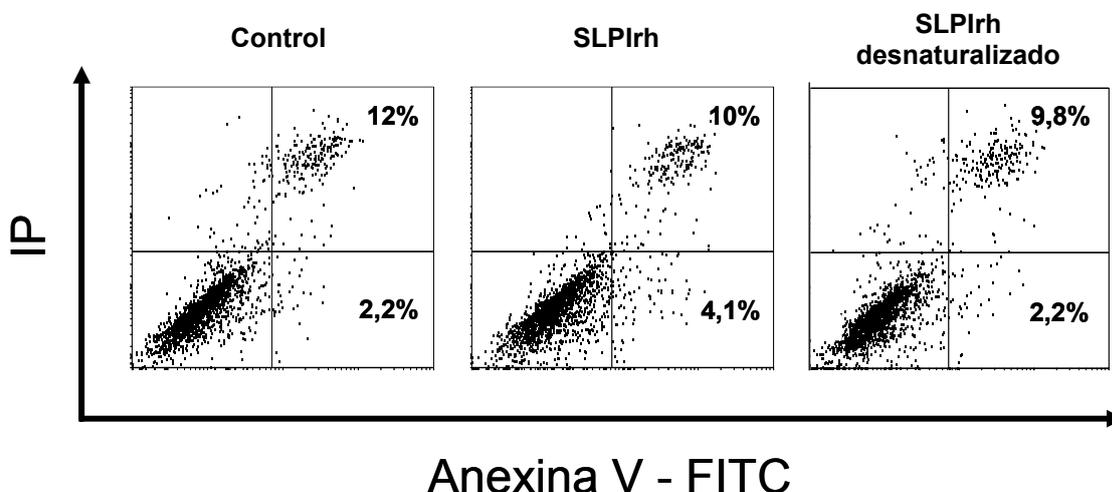


Figura 32. Efecto del tratamiento *in vitro* de células F3II con SLPIrh nativo y desnaturalizado. Células F3II (9×10^5 /well) fueron cultivadas en medio completo y tratadas con 4 $\mu\text{g/ml}$ de SLPIrh, 4 $\mu\text{g/ml}$ de SLPIrh desnaturalizado o buffer de dilución de la proteína (control) a 37°C durante 48 hs. La apoptosis fue medida como se detalla en la **Figura 25**. Se muestra un experimento representativo de dos con similares resultados.

6. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DEL EFECTO ANTITUMORAL DEL SLPI EXÓGENO

La especificidad del efecto antitumoral de SLPIrh fue evaluada utilizando otros modelos tumorales. Para lo cual se utilizaron las líneas celulares CT26 y LP07. La primera proviene de un adenocarcinoma colorectal murino indiferenciado que fue establecido a partir de un tumor transplantable inducido por N-nitroso-N-metiluretano¹⁷⁴ y LP07 es una línea celular derivada de un carcinoma de pulmón de ratones BALB/c¹⁷⁵.

Los resultados de estos experimentos mostraron que los ratones inoculados con la línea celular LP07 y tratados con SLPIrh siguiendo un protocolo igual al utilizado en el tratamiento de los animales que habían sido inoculados con la línea F3II, no sólo no presentaron diferencias en el crecimiento tumoral sino que además disminuyeron, aunque levemente, su sobrevivencia (**Figura 33A y B**); y aumentaron las metástasis pulmonares (datos no mostrados).

Por el contrario, los animales inoculados con la línea celular CT26 (adenocarcinoma de colon) y que recibieron la administración subcutánea de SLPIrh, presentaron una ligera disminución en el crecimiento tumoral y una mayor sobrevida (Figura 33C y D) comparado con los animales que recibieron el buffer de dilución de la proteína (control). Es importante destacar que la tasa de crecimiento de las células CT26 en ratones BALB/c es significativamente mayor que F3II y LP07 por lo que los experimentos fueron más cortos.

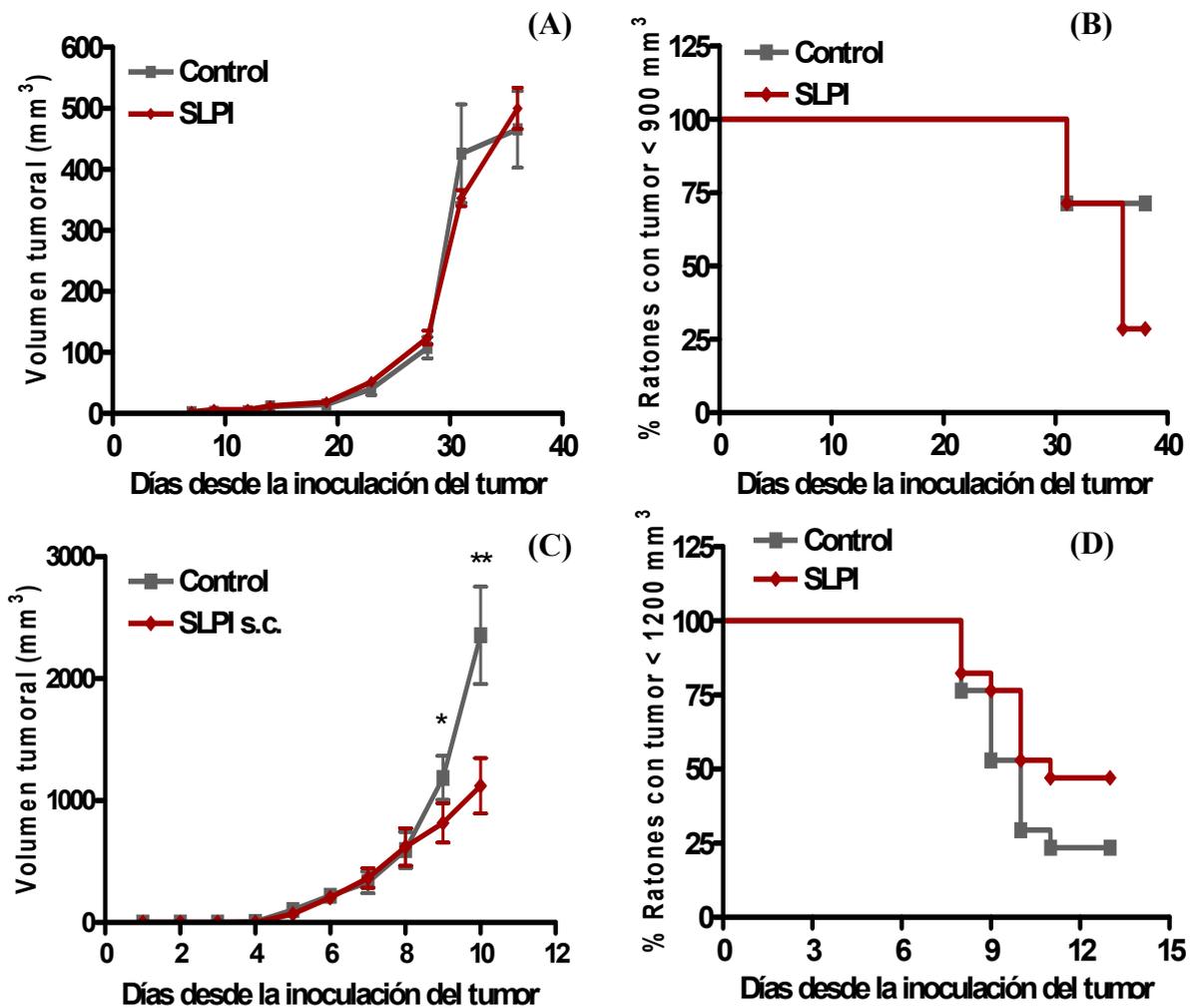


Figura 33. Efecto diferencial de SLPIrh sobre el crecimiento tumoral en ratones BALB/c inoculados con células LP07 y CT26. Ratones BALB/c fueron inoculados s.c. en su flanco izquierdo con 3×10^5 células LP07 (A) o 5×10^5 células CT26 (C) y tratados de forma s.c. con SLPIrh (4 $\mu\text{g/ml}$) o buffer de dilución en el sitio del tumor. El crecimiento tumoral fue monitoreado por diez días (C) o treinta y siete días (A). Se muestra la Media \pm SD de un experimento representativo de dos para A y tres para C. Cada grupo contiene diez animales. En B y D se muestra el gráfico de sobrevida de Kaplan-Meier de los animales de los experimentos graficado en A y C respectivamente.

7. EFECTO ANTITUMORAL DEL SLPI MICROENCAPSULADO

Teniendo en cuenta estos resultados y con el objeto de sustituir repetidas administraciones de SLPIrh decidimos inocular microesferas de poli-ε-caprolactona (PCL) cargadas con SLPIrh en animales portadores de tumor generados con células F3II. Estas microesferas cargadas con SLPIrh liberan la proteína de una forma sostenida por, al menos, 40 días. La liberación continua de la proteína fue observada en ensayos *in vitro* (datos no mostrados). Como se muestra en la **Figura 31**, las microesferas cargadas con SLPIrh, pero no las no cargadas, administradas semanalmente en forma i.p., inhibieron el crecimiento tumoral, de manera similar al SLPIrh exógeno administrado cada dos días.

En resumen, todos estos resultados mostraron que la administración exógena de SLPI provoca un efecto antitumoral, al menos en un modelo utilizando células tumorales mamarias. Además, se pudo observar, que el SLPIrh, tanto nativo como desnaturalizado, presenta actividad antitumoral cuando los mismos son administrados por vía s.c. en el sitio del tumor o cuando son liberados en forma sostenida por las microesferas inyectadas por vía i.p.

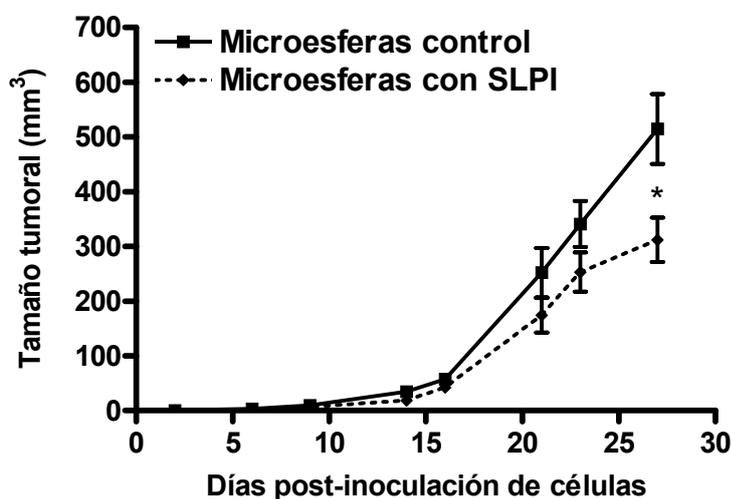


Figura 31. Efecto de la administración de microesferas cargadas con SLPIrh sobre el crecimiento tumoral. Ratones BALB/c fueron inoculados de forma s.c. con 8×10^5 células F3II y tratados de forma i.p. con microesferas (75 mg/ml de microesferas) cargadas con SLPIrh o con buffer (microesferas control). La administración de las mismas fue realizada una vez por semana. El crecimiento tumoral fue monitoreado por 27 días. * $p < 0.05$ (*Test t de Student para datos no apareados*). Se muestra la Media \pm SD de un experimento representativo de tres con resultados similares. Cada grupo contiene 5 animales.

En resumen, podemos decir que, para el modelo de carcinoma mamario pudimos observar un claro efecto antitumoral del SLPI tanto administrado de forma exógena como el generado por las propias células tumorales. En el modelo de carcinoma de colon pudimos ver también un efecto antitumoral aunque no tan marcado y, en el modelo de carcinoma de pulmón no se observaron diferencias entre los animales tratados con SLPIrh y los no tratados en cuanto a los volúmenes tumorales, aunque los animales que recibieron la proteína tuvieron una menor sobrevida. De esta forma, estos resultados indican que el efecto antitumoral de SLPI es específico para ciertos tipos de tumores.

Además, se pudo observar, que el SLPIrh, tanto nativo como desnaturalizado, presenta actividad antitumoral en el modelo de carcinoma mamario cuando es administrado por vía s.c. en el sitio del tumor o cuando es liberado en forma sostenida por las microesferas inyectadas por vía i.p.

A pesar de los recientes avances en las modalidades de tratamientos, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Además, la incidencia de algunos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, piel, próstata y riñón continúa incrementándose. El cáncer es, en realidad, un término general que se refiere a más de cien enfermedades distintas que afectan a muchos tejidos diferentes y tipos celulares. Sin embargo, como ya se mencionó, todas las formas de cáncer se caracterizan por crecimiento celular anormal. Para que una célula se vuelva maligna debe adquirir las siguientes características: (1) independencia de factores de crecimiento (2) insensibilidad frente a señales antiproliferativas (3) evasión de la muerte celular programada (apoptosis) (4) potencial replicativo ilimitado (5) angiogénesis sostenida (6) invasión de tejidos y metástasis² y (7) evasión de la inmunovigilancia⁵². Es precisamente este último aspecto, el que fue investigado en esta tesis doctoral.

Muchos han sido los mecanismos descritos de evasión de la respuesta inmune anti-tumoral, por ejemplo la disminución de la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, la mayor resistencia a la apoptosis por expresión de proteínas de la familia de Bcl-2, la sobreexpresión de proteínas reguladoras del complemento sobre la superficie de células tumorales, la producción de citoquinas inmunosupresoras (por ejemplo IL-10) y la inducción de tolerancia, la producción de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la inducción de células dendríticas tolerigénicas, entre otros^{60,179-183}.

A todos estos mecanismos, se han sumado en los últimos años algunos otros factores, como por ejemplo la expresión de Galectina-1 y SPARC. La primera, pertenece a una familia de proteínas que poseen afinidad por azúcares β -galactósidos, y fue descrita como una proteína que cumple un rol esencial en el escape de células tumorales debido a su capacidad de inducción de apoptosis de linfocitos T¹⁰⁰. SPARC, también producida por las células malignas, cumple un rol importante en el escape de las células tumorales de la inmunovigilancia debido a que es capaz de bloquear la actividad antitumoral de los leucocitos polimorfonucleares⁷⁶.

Los resultados iniciales obtenidos con el SLPI, también nos hicieron especular sobre un posible rol del SLPI en los mecanismos de escape tumoral. Esta proteína denominada Inhibidor Secretorio de Proteasas Leucocitarias es una proteína básica (pI \approx 9,5), policatiónica, no glicosilada de 107 aminoácidos con un peso molecular de 11,7 kDa, formada por dos dominios, cada uno de los cuales contiene ocho residuos de cisteína que forman 4 puentes disulfuro que estabilizan la estructura de la molécula¹⁰⁷. La misma posee con gran afinidad por las serino proteasas neutrofilicas como la elastasa y la catepsina G¹⁰⁶.

En la presente tesis pudimos observar que al actuar sobre células epiteliales, el SLPI, produce una disminución en la expresión de las moléculas de histocompatibilidad de clase I. Este dato inicial, se sumaba a las acciones ya descritas del SLPI como molécula con actividad anti-elastasa y por lo tanto anti-inflamatoria. Esta última acción, se vio reforzada al demostrarse que SLPI podía bloquear la acción del LPS¹⁸⁴ e inhibir la translocación de NF- κ B al núcleo por interferir en la degradación de I κ B¹³². Por otro lado, los graves problemas de cicatrización de heridas en los ratones *knock out* para SLPI, demostraron un rol esencial en la reparación y cicatrización de heridas¹³¹. Otras funciones descritas para el SLPI han sido su actividad microbicida para algunas bacterias, virus y hongos¹³¹. En este sentido, recientemente nuestro grupo de trabajo ha propuesto que el SLPI es un nuevo receptor soluble de reconocimiento de patrones moleculares asociados al patógeno¹⁸⁵. Todas estas acciones, hacen pensar al SLPI como una molécula multifacética¹³¹ con acciones sobre la respuesta inmune innata. De hecho los altos niveles de SLPI plasmáticos en las primeras horas post-infección han hecho que se postule al SLPI como una proteína de alarma.

Estos datos sobre el rol del SLPI en la respuesta inmune innata contrastan con la ausencia de trabajos sobre el rol de SLPI en la respuesta inmune adaptativa. Al respecto, en esta tesis describimos un efecto inhibitor del SLPI sobre la proliferación linfocitaria inducida por estímulos mitogénicos. Este efecto fue similar al descrito para otro inhibidor de serino proteasas uterino¹⁸⁶ y se sumaba a la disminución en la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase I y de CD54. Por lo tanto, hasta aquí uno podía especular que SLPI al disminuir la proliferación linfocitaria y al disminuir la

expresión de CD54 y de MHC de clase I estaría favoreciendo la evasión de la respuesta inmune, al perjudicar el reconocimiento e interacción entre linfocitos T (CD8) y células tumorales. La ausencia de reconocimiento por parte de la respuesta inmune de las células tumorales pre-tratadas con SLPI se vio reforzada por que los experimentos realizados con células NK *in vitro*, no permitieron demostrar una activación y efecto citotóxico de las mismas sobre las células epiteliales que habían sufrido la acción del SLPI y que por lo tanto tenían una menor expresión de MHC de clase I. Una posible explicación para la ausencia de efecto de las células NK sobre las células epiteliales tratadas con SLPI podría ser que los niveles de disminución de MHC de clase I no fueran lo suficientemente importantes como para activar a las células NK o que el tratamiento con SLPI estuviera aumentando la expresión de ligandos de los receptores inhibidores de las células NK. Sea cual fuera la explicación, otro dato importante a tener en cuenta fue la menor expresión de CD29 (una integrina de gran importancia en las interacciones célula-matriz extracelular) en las células tratadas con SLPI e incluso en las células tranfectadas con el gen de SLPI. Esta menor expresión de CD29 nos estaría sugiriendo que SLPI no sólo favorecería la evasión de la respuesta inmune sino también facilitaría la formación de metástasis al hacer a las células menos adherentes a los diversos componentes de la matriz extracelular.

Todos estos resultados sugieren que tanto la respuesta inmune innata como la respuesta inmune adaptativa parecen ser afectadas por el SLPI. Siendo ambas respuestas inmunes importantes en los fenómenos de inmunovigilancia e immunoedición de procesos tumorales, y además, teniendo en cuenta que ciertas células tumorales producen SLPI, esta molécula parecería de suma importancia para comprender los posibles mecanismos que llevan al reconocimiento o no de las células tumorales por las células de la respuesta inmune.

Existen muchos trabajos donde se estudia la expresión de SLPI en tumores y tratan de asociar la expresión con el grado de malignidad^{138,158,159,162}. Sin embargo, otros trabajos asumen que SLPI es una proteína con capacidad de inhibir la agresividad del tumor a través de la inhibición de la actividad de proteasas liberadas por el mismo^{187,188}.

Es probable que los efectos del SLPI dependan del tipo celular sobre el que actúa. En nuestro caso, por ejemplo observamos que la expresión de CD54 sólo se afecta en células tumorales, pero no en monocitos. Esto no indica ausencia de sensibilidad del monocito al SLPI, ya que otra molécula como MHC de clase II se vio disminuida en monocitos, pero no en células dendríticas. En conjunto estos resultados demuestran que el efecto del SLPI sobre la expresión de moléculas de superficie depende del tipo celular que se estudie.

La acción observada del SLPI sobre la expresión de las moléculas de MHC de clase I, nos hizo pensar que el SLPI producido por las células tumorales cumpliría un rol en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral, al evitar el reconocimiento de los antígenos tumorales por parte de los LT citotóxicos específicos y al impedir una correcta interacción célula-célula, la cual depende, en parte, de la interacción CD54 (ICAM-1) con LFA-1 presente sobre los leucocitos. A estos datos se le suman los resultados obtenidos por otros autores que demuestran con células tumorales de pulmón que sobreexpresan SLPI, que esta molécula incrementa la tumorigenicidad y el potencial metastático de dichas células¹⁶². Más aún, la inducción de la apoptosis de las células de tumor ovárico en respuesta a la neutralización de SLPI, junto a una correlación directa entre los niveles de expresión de SLPI y la agresividad del tumor^{138,152,154,157} refuerzan el concepto de que SLPI es un factor que favorecería la supervivencia, al menos para determinados tipos de tumores.

Sin embargo, en un modelo de metástasis hepática, SLPI demostró tener un efecto anti-metastásico por un mecanismo alternativo, probablemente basado en la inhibición de la activación del endotelio¹⁶⁸. En otro modelo, fue demostrado que el SLPI sobreexpresado en células tumorales mamarias promovió el crecimiento *in vivo* de las mismas y las metástasis espontáneas al pulmón; mientras que suprimió la actividad invasiva *in vitro*¹⁶⁹. Más recientemente, se ha descrito que SLPI es capaz de inhibir el crecimiento tumoral a través de un mecanismo apoptótico en células de cáncer de ovario¹⁷¹.

Como puede verse por todo lo mencionado, han sido descritas actividades pro y anti-tumorales para SLPI, pero en ningún caso hasta la presente tesis doctoral se había

examinado el efecto de la administración exógena de la proteína sobre el crecimiento tumoral. Son estos últimos experimentos que nos permiten concluir sobre la actividad antitumoral del SLPI, al menos para determinado tipo de tumores.

Como ya mencionamos, en un modelo similar al utilizado por nosotros, Devgoodt *et. al.* observó que el SLPI expresado por células tumorales sobreproductoras de dicha proteína promovía la tumorigenicidad y el potencial metastásico de dichas células tumorales¹⁶². Las principales diferencias entre este trabajo y el nuestro son la utilización de células tumorales diferentes a las usadas en nuestro modelo y el uso de ratones SCID (ratones con inmunodeficiencia combinada severa). Sin embargo, otros trabajos sustentan el hallazgo de estos autores. Por ejemplo, Cheng *et. al.*¹⁸⁹ también observa algo similar a Devoogdt. En este reciente trabajo, Cheng utiliza células de cáncer gástrico, un tipo celular diferente al nuestro. De hecho, en esta tesis tampoco observamos efecto antitumoral al utilizar células de adenocarcinoma de pulmón. Por lo tanto, un factor crítico es el tipo celular utilizado. Sin embargo, no es posible descartar otros factores como por ejemplo la existencia de una concentración límite crítica para observar el efecto antitumoral del SLPI. Esto se pudo observar al utilizar a los clones B3 (moderados productores de SLPI), los que tuvieron un crecimiento similar al del control en la mayoría de los experimentos examinados.

En esta tesis, nosotros evaluamos también el comportamiento de un tipo de tumor de alta tasa de crecimiento, como es el carcinoma de colon inducido por la administración de células CT26. En este caso, observamos una reducción significativa en cuanto a los volúmenes medidos al final del experimento y a la supervivencia, en respuesta a la administración de SLPI. Cabe aclarar que en este modelo la diferencia observada tal vez no sea tan marcada como en los experimentos con células F3II debido a que las células CT26 desarrollan tumores a una tasa de crecimiento mucho mayor que las observadas con la línea F3II, por lo que los ratones deben ser sacrificados relativamente pronto (a los 13 días).

En lo que respecta al efecto del SLPI sobre las células de carcinoma de pulmón (LP07), el SLPIrh administrado de forma exógena no produjo ninguna diferencia en cuanto a los

volúmenes tumorales. Pero lo más llamativo fue que los animales tratados con SLPIrh tuvieron una sobrevida levemente menor que los animales control y mayor número de metástasis pulmonares (dato no mostrado).

A esta altura de la discusión cabe la pregunta sobre: ¿qué hace que un tipo celular sea sensible o insensible al SLPI? Al día de hoy, desconocemos la respuesta a esta pregunta. Podríamos especular sobre diferencias a nivel de los receptores postulados para SLPI o diferencias relacionadas a los blancos intracelulares del SLPI en cada tipo celular. Al respecto es interesante señalar que SLPI sería capaz de entrar a las células y localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma afectando la activación de NF- κ B al unirse directamente a los sitios de unión de NF- κ B de manera específica. Este mecanismo de unión de SLPI en el interior celular podría ser diferente según el tipo celular. Una vez en el interior de la célula, el SLPI previene la degradación de varias proteínas reguladoras de la activación de NF- κ B, incluyendo I κ B α , I κ B β . La inhibición de la degradación de las proteínas I κ B no permite su liberación del complejo que forman con NF- κ B, impidiendo de esta forma la entrada de NF- κ B al núcleo y la consecuente activación de la transcripción de genes^{132,133}, como por ejemplo el promotor de la proteína anti-apoptótica Bcl-X_L. En el mismo trabajo se describe que células tumorales de origen pancreático al ser tratadas de forma exógena con un inhibidor que bloquea la degradación intracelular de I κ B α , transforma a estas células en sensibles a la apoptosis inducida por Taxol¹⁹⁰. De esto se deduce que inhibidores de la degradación de las proteínas I κ B, como por ejemplo SLPI, pueden volver a las células tumorales más sensibles a factores pro-apoptóticos.

Independientemente del motivo que genere las diferencias entre los distintos tipos celulares, en este trabajo, la actividad antitumoral de SLPI en el modelo de cáncer de mama, se sustenta en el hecho que la administración exógena de SLPI tiene un efecto antitumoral similar al que se observa para las células de tumor mamario que sobre-expresan SLPI. Es importante mencionar que aunque en la presente tesis se utilizó SLPI humano en un modelo murino, esta proteína humana presenta un grado de identidad de 58 % con la proteína murina y tiene efecto sobre células murinas. Más aún, en este trabajo se demuestra que el SLPI humano disminuye la proliferación de esplenocitos

murinos *in vitro*. Por otro lado, la diferente respuesta antitumoral en tres modelos tumorales diferentes (LP07, CT26 y F3II), en ratones BALB/c, demuestra que el efecto antitumoral del SLPI exógeno no se debe a una posible respuesta inmune contra la molécula humana.

Un hecho importante en la presente tesis ha sido también describir que el efecto antitumoral del SLPI exógeno no depende de la actividad anti-proteasa del péptido. Esto está basado en experimentos que muestran que la molécula de SLPI desnaturalizada por pH ácido mantiene su actividad antitumoral. Este dato presenta gran importancia fisiopatológica, teniendo en cuenta que la actividad anti-proteasa de la proteína podría ser inhibida debido al microambiente ácido de la masa tumoral¹⁹¹.

A pesar, que la actividad antitumoral de SLPI se mantiene en un medio ácido, de los experimentos presentados se desprende la necesidad que la proteína se encuentre en altas concentraciones cerca o dentro del tumor para tener su efecto antitumoral, ya que la administración intraperitoneal del péptido no presentó actividad antitumoral. En cambio, la administración intratumoral del mismo o aún su liberación continua (utilizando las microesferas administradas por vía i.p. que tienen entrampada a la proteína) exhiben una clara y significativa inhibición del tumor.

Las diferencias de crecimiento *in vivo* e *in vitro* de los clones 2C1 es un dato destacado. Es posible asumir que la proliferación *in vivo* de las células sobreproductoras de SLPI podría ser controlada por células y factores del sistema inmune del huésped. De hecho, esto es avalado por los experimentos *in vivo* con ratones Nude y ratones depletados de neutrófilos. En ratones Nude, los clones 2C1 fueron capaces de crecer. Sin embargo, la depleción de neutrófilos juega un papel importante ya que el crecimiento del tumor inducido por la administración del clon 2C1 es mayor en los ratones depletados de neutrófilos que en los ratones Nude e inmunocompetentes. Esto coloca a los neutrófilos como una de las principales células en mediar el efecto antitumoral. De hecho, se pudo observar en cortes histológicos de tumores, a los que se le había administrado SLPI, un importante infiltrado de leucocitos polimorfonucleares (PMN).

Durante los últimos años, ha sido descrita la participación de los PMN en mecanismos de vigilancia inmunológica contra los tumores⁵⁰. Así, los neutrófilos participan en el rechazo tumoral que sigue a la inyección de células tumorales que expresan diferentes citoquinas y quimoquinas^{77,192}. Además, como ya se mencionó, ha sido demostrado que la proteína secretada SPARC producida por células de melanoma humano presenta un papel regulador en el reclutamiento de PMN en el sitio del crecimiento tumoral y en la activación de su capacidad citotóxica antitumoral⁷⁶. Asimismo, otros autores han mostrado que el rechazo tumoral por los neutrófilos estaba asociado con una necrosis coligativa; lo que indica que la muerte de las células tumorales es inducida por los PMN⁷⁷.

Sin embargo, no toda la respuesta antitumoral mediada por SLPI se puede explicar con los neutrófilos, ya que la administración del clon 2C1 a ratones Nude, a diferencia de los ratones inmunocompetentes, generan tumores, aunque de volúmenes inferiores a los obtenidos con el clon B3 o con las células control. La existencia de memoria inmunológica que se observa al inocular células F3II en ratones inmunocompetentes que habían sido inoculados previamente con el clon 2C1 y que no habían desarrollado tumor, nos permitieron concluir un rol importante de la respuesta inmune adaptativa en el rechazo del tumor.

En conjunto, los experimentos en ratones Nude y en ratones inmunocompetentes depletados de neutrófilos sustentan un rol de la respuesta inmune innata y adaptativa. Sin embargo, la incapacidad de revertir totalmente el efecto antitumoral sugiere que otros factores podrían estar involucrados en la respuesta antitumoral; como por ejemplo la inducción de apoptosis. En este sentido nuestros experimentos con el plasma de los ratones inoculados con el clon 2C1, hiperproductor de SLPI, demuestran la presencia de factores pro-apoptóticos en dicho plasma capaces de inducir la muerte celular programada del clon 2C1 *in vitro*. A pesar de desconocer la naturaleza de este factor apoptótico, sabemos que la concentración plasmática de este o estos factores apoptóticos aumentan en el tiempo post-inoculación de las células tumorales. También sabemos que este factor no es SLPI, ya que el SLPI *in vitro* no fue capaz de inducir la apoptosis de las células tumorales. Por el contrario, el SLPI es capaz de inhibir la

apoptosis de células tumorales humanas *in vitro* (dato no mostrado). Por lo tanto, creemos que las células productoras de SLPI promueven la producción de factores pro-apoptóticos, los que podrían ser derivados de las células de la respuesta inmune innata (por ejemplo de los neutrófilos), demostrando que el efecto antitumoral del SLPI es un efecto indirecto.

Varios factores apoptóticos han sido reconocidos por inducir la muerte de las células tumorales¹⁹³. Entre ellos, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), CD95 ligando y el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL) son los mejor caracterizados¹⁹⁴. El último es un miembro de la familia de genes TNF inductores de apoptosis que incluyen a TNF, CD95L y la linfotoxina alfa, entre otros. Los miembros de la familia TNF interactúan con sus respectivos receptores de superficie celulares y activan la vía de muerte celular e incluye a TNFR1, CD95, receptor de muerte 3 (DR3), DR4, DR5 y DR6¹⁹⁵.

Aunque la acción antitumoral del SLPI la pudimos observar tanto en los animales tratados con células tumorales productoras de la proteína como en los inoculados con células F3II y tratados con SLPI de forma exógena, a la fecha no sabemos si el mecanismo de rechazo generado es el mismo en ambos casos. Actualmente, en nuestro laboratorio, estamos realizando experimentos para aclarar este punto, como así también si el factor pro-apoptótico es un factor derivado de los neutrófilos.

Muchos de los resultados aquí presentados confirman la acción antitumoral del SLPI. Sin embargo, no se puede ignorar la acción pro-tumoral de SLPI descrita por otros autores y demostrado en esta tesis en el modelo LP07 (menor sobrevida y mayor metástasis). Como ya se mencionó, es posible especular que las razones para esta discrepancia, podrían estar asociadas a: i) el tipo de tumor; ii) la respuesta inmune montada por los tumores; iii) la participación y el estado de activación de los neutrófilos en el infiltrado tumoral; y iv) la sensibilidad de las células tumorales al factor apoptótico inducido por las células tumorales productoras de SLPI.

Teniendo en cuenta las diferencias informadas en cuanto al SLPI como un factor anti-tumoral o pro-tumoral, podemos pensar también que el efecto no solo puede estar relacionado con el tipo de células tumorales; sino también con el momento de la progresión del tumor. Tal vez, cantidades pequeñas de SLPI en los primeros momentos de generación de células malignas son suficientes para llevar a la destrucción de las células tumorales, ya sea por reclutamiento de células del sistema inmune o por inducir a las mismas a que generen y liberen factores pro-apoptóticos. De un análisis detallado de los trabajos publicados, se puede observar^{138,152,154,157} que todos han sido realizados en pacientes en estadios bastante avanzados de la enfermedad. Quizás en estas instancias del crecimiento tumoral, el SLPI se comporte como un factor pro-tumoral e inclusive inductor de metástasis. De ser esto cierto podríamos especular sobre un efecto dual del SLPI según el momento de la progresión tumoral del paciente.

Evidentemente, desde un punto de vista terapéutico será fundamental identificar que tipo de tumor será sensible al SLPI; para lo cual será fundamental identificar el mecanismo de acción del SLPI sobre la célula tumoral y si este es mediado o no a través de receptores. A la fecha no se conoce fehacientemente la existencia de un receptor para el SLPI. Sin embargo en base a trabajos publicados con anterioridad sabemos que SLPI se une a la proteína de unión a fosfolípidos, anexina II en la membrana de macrófagos humanos. Esta molécula es un cofactor celular que interviene en la infección de los macrófagos por HIV-1; por lo que el SLPI sería capaz de impedir la unión del virus a la superficie del macrófago y por lo tanto evitaría la infección¹²⁶. También ha sido postulado que la proteína humana escramblasa es una proteína de unión a SLPI. Es interesante destacar que escramblasa está involucrada en el movimiento de los fosfolípidos de membrana y ha sido sugerido que la interacción entre SLPI y la misma podría estabilizar la membrana, previniendo de esta forma la fusión del HIV-1 con la membrana de la célula del huésped dando otra posible explicación para la actividad anti-HIV-1 del SLPI¹⁹⁶. De todas formas aún ignoramos si la actividad antitumoral del SLPI se debe a la acción del mismo sobre un receptor celular o no. En la actualidad también estamos llevando a cabo experimentos para aclarar este punto.

A pesar de los grandes avances en la terapia contra el cáncer, existe actualmente un considerable interés en el desarrollo de agentes antitumorales con nuevos modos de acción. Aunque los tumores localizados frecuentemente pueden ser tratados exitosamente por cirugía y/o radiación, la quimioterapia permanece como el tratamiento más común para la enfermedad en fases avanzadas. Sin embargo, el uso de agentes quimioterapéuticos convencionales, que atacan a las células tumorales que se están dividiendo rápidamente, está frecuentemente asociado con efectos adversos causados por daño a las células y tejidos sanos. Además, las células tumorales que están quiescentes o proliferando lentamente son refractarias a los efectos citotóxicos de las drogas quimioterapéuticas. Las células tumorales también se vuelven frecuentemente resistentes a la quimioterapia como consecuencia de cambios celulares que incluyen: el aumento de expresión de enzimas detoxificantes de drogas, interacciones alteradas entre la droga y su blanco, una aumentada capacidad para reparar daño al ADN y, defectos en la maquinaria celular que lleva a la apoptosis de la célula. El desarrollo de una nueva clase de drogas antitumorales que carezcan de la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos convencionales y que no sean afectadas por los mecanismos comunes de quimioresistencia sería un avance no menor en el tratamiento del cáncer.

Un creciente número de estudios han mostrado que algunos péptidos catiónicos con actividad antimicrobiana (PCAA), que son tóxicos para las bacterias; pero no para las células normales de los mamíferos, exhiben un amplio espectro de actividad citotóxica contra células tumorales¹⁹⁷. Dentro de los péptidos ya descritos con actividad antitumoral podemos citar a BMAP-28 (carga neta +7), HNP-1 (β -defensina, carga neta +3) y a la lactoferricina B (carga neta +8) que presentan actividad membranolítica, antiangiogénica e inductora de apoptosis¹⁹⁸⁻²⁰³. La atracción electrostática entre los componentes cargados negativamente de las bacterias y las células tumorales y los PCAA cargados positivamente se cree que es la principal causa para la fuerte unión y disrupción selectiva de las membranas de las bacterias y las células tumorales por parte de estos péptidos. Teniendo en cuenta que el SLPI es una proteína pequeña, que posee una actividad antimicrobiana de amplio espectro y que su carga neta es +12 no se puede descartar una acción antitumoral del mismo por mecanismos similares a los informados para estos péptidos catiónicos.

- El agregado exógeno o la sobreproducción endógena del Inhibidor Secretorio de Proteasas Leucocitarias (SLPI) disminuye la expresión de moléculas de superficie tales como MHCI, CD54 y CD29 en células HeLa.
- SLPI disminuye la expresión de CD14 y de MHC de clase II en monocitos y la expresión de MHC de clase I en células dendríticas.
- SLPI disminuye la proliferación de linfocitos humanos y de esplenocitos murinos.
- Las células tumorales murinas hiperproductoras de SLPI, expresan en su superficie, menores niveles de CD29 y MHC de clase I que los controles y poseen una tasa de proliferación *in vitro* mayor.
- Las células tumorales murinas hiperproductoras de SLPI son rechazadas en animales inmunocompetentes. Los leucocitos PMN y células de la respuesta inmune adaptativa median, en parte, dicho fenómeno.
- Existe cierta memoria inmunológica que retarda el crecimiento del tumor generado por células F3II en ratones previamente inoculados con el clon hiperproductor de SLPI; aunque no alcanza a eliminarlo.
- Existe en el plasma de ratones inoculados con células hiperproductoras de SLPI uno o más factores pro-apoptóticos capaces de inducir la muerte celular programada de estas células *in vitro*.

- El SLPI administrado de forma exógena, posee un claro efecto antitumoral y aumenta la sobrevivencia de los animales portadores de tumor en modelos de carcinoma mamario y de colon, pero no en un modelo de cáncer de pulmón.
- La acción antitumoral del SLPI administrado de forma exógena no depende de su actividad anti-proteasa.
- El SLPI podría ser una nueva herramienta en la lucha contra determinados tipos de tumores.

1. Knowles M SP. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. London, UK: Oxford Bioscience; 2005.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
3. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87:159-170.
4. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 1999;400:464-468.
5. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194:23-28.
6. Hinds PW, Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev*. 1994;4:135-141.
7. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991;64:235-248.
8. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*. 1994;372:143-149.
9. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759-767.
10. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88:323-331.
11. Bernards R, Weinberg RA. A progression puzzle. *Nature*. 2002;418:823.
12. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:715-727.
13. Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell*. 1997;88:333-346.
14. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:255-260.
15. Harris CC. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*. 1996;17:1187-1198.
16. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J*. 1992;11:1921-1929.
17. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997;33:787-791.
18. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86:353-364.
19. Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, Fidler IJ. Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:4562-4566.
20. Volpert OV, Dameron KM, Bouck N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene*. 1997;14:1495-1502.
21. Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem*. 1996;271:10079-10086.
22. Gately S, Twardowski P, Stack MS, et al. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:10868-10872.

23. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet*. 1996;347:1377-1381.
24. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*. 1998;50:197-263.
25. Varner JA, Cheresh DA. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8:724-730.
26. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*. 1997;91:439-442.
27. Lin KW, Jacek T, Jacek R. Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity. *J Cancer Res Ther*. 2006;2:35-40.
28. Chen ZW. Comparative biology of gamma delta T cells. *Sci Prog*. 2002;85:347-358.
29. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol*. 2000;37:1141-1149.
30. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:4-9.
31. Abbas AK, Lichtman, A.H, and Pober, J.S. *Inmunología Celular y Molecular*. Madrid, España; 2003.
32. Janeway C. *Immunobiology the immune system in health and disease*. New York, US; 1999.
33. Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2000;68:9-14.
34. Chen Y, Wood KJ. Interleukin-23 and TH17 cells in transplantation immunity: does 23+17 equal rejection? *Transplantation*. 2007;84:1071-1074.
35. Wan YY, Flavell RA. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev*. 2007;220:199-213.
36. Stutman O. Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J Natl Cancer Inst*. 1979;62:353-358.
37. Nehlsen SL. Immunosuppression, virus and oncogenesis in mice. *Transplant Proc*. 1971;3:811-813.
38. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:323-370.
39. van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med*. 1996;184:1781-1790.
40. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:7556-7561.
41. Clemente CG, Mihm MC, Jr., Bufalino R, Zurrada S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996;77:1303-1310.
42. Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J Cancer*. 1991;49:44-49.

43. Lipponen PK, Eskelinen MJ, Jauhiainen K, Harju E, Terho R. Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer. *Eur J Cancer*. 1992;29A:69-75.
44. Naito Y, Saito K, Shiiba K, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58:3491-3494.
45. Roitt M BJ, Male, D. *Inmunología*. Barcelona, ESP; 1994.
46. Ochsenbein AF. Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer Gene Ther*. 2002;9:1043-1055.
47. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008;9:503-510.
48. Lucas T, Abraham D, Aharinejad S. Modulation of tumor associated macrophages in solid tumors. *Front Biosci*. 2008;13:5580-5588.
49. Vieweg J, Jackson A. Modulation of antitumor responses by dendritic cells. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;26:329-341.
50. Di Carlo E, Forni G, Lollini P, Colombo MP, Modesti A, Musiani P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood*. 2001;97:339-345.
51. Rabinovich G. *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina*. Buenos Aires, ARG; 2004.
52. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3:991-998.
53. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;121:1-14.
54. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science*. 2001;294:605-609.
55. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*. 2001;2:293-299.
56. Reichert TE, Rabinowich H, Johnson JT, Whiteside TL. Mechanisms responsible for signaling and functional defects. *J Immunother*. 1998;21:295-306.
57. Ochsenbein AF. Immunological ignorance of solid tumors. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;27:19-35.
58. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:641-654.
59. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. 2003;9:1269-1274.
60. Terness P, Bauer TM, Rose L, et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*. 2002;196:447-457.
61. Huang Y, Obholzer N, Fayad R, Qiao L. Turning on/off tumor-specific CTL response during progressive tumor growth. *J Immunol*. 2005;175:3110-3116.
62. Zhou G, Lu Z, McCadden JD, Levitsky HI, Marson AL. Reciprocal changes in tumor antigenicity and antigen-specific T cell function during tumor progression. *J Exp Med*. 2004;200:1581-1592.

63. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531-562.
64. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:263-274.
65. Fainboim-Geffner. *Introducción a la Inmunología humana.* Buenos Aires; 2005.
66. Chiarugi P. Reactive oxygen species as mediators of cell adhesion. *Ital J Biochem.* 2003;52:28-32.
67. Usatyuk PV, Natarajan V. Regulation of reactive oxygen species-induced endothelial cell-cell and cell-matrix contacts by focal adhesion kinase and adherens junction proteins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289:L999-1010.
68. Moraes TJ, Zurawska JH, Downey GP. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr Opin Hematol.* 2006;13:21-27.
69. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* 1995;16:21-26.
70. Romani L, Bistoni F, Puccetti P. Initiation of T-helper cell immunity to *Candida albicans* by IL-12: the role of neutrophils. *Chem Immunol.* 1997;68:110-135.
71. Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY, Schreiber H. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J Exp Med.* 1995;181:435-440.
72. Simons MP, O'Donnell MA, Griffith TS. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urol Oncol.* 2008;26:341-345.
73. Ho MY, Sun GH, Leu SJ, Ka SM, Tang SJ, Sun KH. Combination of FasL and GM-CSF confers synergistic antitumor immunity in an in vivo model of the murine Lewis lung carcinoma. *Int J Cancer.* 2008;123:123-133.
74. Challacombe JM, Suhrbier A, Parsons PG, et al. Neutrophils are a key component of the antitumor efficacy of topical chemotherapy with ingenol-3-angelate. *J Immunol.* 2006;177:8123-8132.
75. Hernandez-Ilizaliturri FJ, Jupudy V, Ostberg J, et al. Neutrophils contribute to the biological antitumor activity of rituximab in a non-Hodgkin's lymphoma severe combined immunodeficiency mouse model. *Clin Cancer Res.* 2003;9:5866-5873.
76. Alvarez MJ, Prada F, Salvatierra E, et al. Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity. *Cancer Res.* 2005;65:5123-5132.
77. Musiani P, Allione A, Modica A, et al. Role of neutrophils and lymphocytes in inhibition of a mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IFN-alpha, IFN-gamma, and TNF-alpha. *Lab Invest.* 1996;74:146-157.
78. Stoppacciaro A, Melani C, Parenza M, et al. Regression of an established tumor genetically modified to release granulocyte colony-stimulating factor requires granulocyte-T cell cooperation and T cell-produced interferon gamma. *J Exp Med.* 1993;178:151-161.
79. Hara N, Ichinose Y, Asoh H, Yano T, Kawasaki M, Ohta M. Superoxide anion-generating activity of polymorphonuclear leukocytes and monocytes in patients with lung cancer. *Cancer.* 1992;69:1682-1687.
80. Hara N, Ichinose Y, Motohiro A, Kuda T, Aso H, Ohta M. Influence of chemotherapeutic agents on superoxide anion production by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer.* 1990;66:684-688.

81. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994;84:2068-2101.
82. Di Carlo E, Coletti A, Modesti A, Giovarelli M, Forni G, Musiani P. Local release of interleukin-10 by transfected mouse adenocarcinoma cells exhibits pro- and anti-inflammatory activity and results in a delayed tumor rejection. *Eur Cytokine Netw*. 1998;9:61-68.
83. Lopez-Lazaro M. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): a novel anticancer therapy based on the "universal dynamics of tumor growth"? *Exp Oncol*. 2006;28:249-251.
84. Dallegrì F, Ottonello L, Ballestrero A, et al. Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation*. 1991;15:15-30.
85. Dissemond J, Weimann TK, Schneider LA, et al. Activated neutrophils exert antitumor activity against human melanoma cells: reactive oxygen species-induced mechanisms and their modulation by granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor. *J Invest Dermatol*. 2003;121:936-938.
86. Kindzelskii AL, Petty HR. Early membrane rupture events during neutrophil-mediated antibody-dependent tumor cell cytotoxicity. *J Immunol*. 1999;162:3188-3192.
87. Bratt J, Palmblad J. Cytokine-induced neutrophil-mediated injury of human endothelial cells. *J Immunol*. 1997;159:912-918.
88. Koga Y, Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H, Hara T. Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils. *Cancer Res*. 2004;64:1037-1043.
89. Cassatella MA, Huber V, Calzetti F, et al. Interferon-activated neutrophils store a TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) intracellular pool that is readily mobilizable following exposure to proinflammatory mediators. *J Leukoc Biol*. 2006;79:123-132.
90. Tecchio C, Huber V, Scapini P, et al. IFN α -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood*. 2004;103:3837-3844.
91. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:401-409.
92. Kagi D, Ledermann B, Burki K, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*. 1994;369:31-37.
93. Shi L, Mai S, Israels S, Browne K, Trapani JA, Greenberg AH. Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J Exp Med*. 1997;185:855-866.
94. Hersey P, Zhang XD. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:142-150.
95. Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2001;21:8247-8254.
96. Medema JP, de Jong J, Peltenburg LT, et al. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:11515-11520.

97. Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*. 1998;396:699-703.
98. Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, et al. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev*. 2002;188:97-113.
99. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med*. 2002;195:1303-1316.
100. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*. 2004;5:241-251.
101. Cho D, Song H, Kim YM, et al. Endogenous interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates. *Cancer Res*. 2000;60:2703-2709.
102. Gastman BR, Atarshi Y, Reichert TE, et al. Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res*. 1999;59:5356-5364.
103. Igney FH, Krammer PH. Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54:1127-1136.
104. Thompson RC, Ohlsson K. Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:6692-6696.
105. Seemuller U, Arnhold M, Fritz H, et al. The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions (HUSI-I, antileukoprotease). Complete amino acid sequence as revealed by protein and cDNA sequencing and structural homology to whey proteins and Red Sea turtle proteinase inhibitor. *FEBS Lett*. 1986;199:43-48.
106. Moreau T, Baranger K, Dade S, Dallet-Choisy S, Guyot N, Zani ML. Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. *Biochimie*. 2008;90:284-295.
107. Grutter MG, Fendrich G, Huber R, Bode W. The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin. *Embo J*. 1988;7:345-351.
108. Stetler G, Brewer MT, Thompson RC. Isolation and sequence of a human gene encoding a potent inhibitor of leukocyte proteases. *Nucleic Acids Res*. 1986;14:7883-7896.
109. Moriyama A, Shimoya K, Kawamoto A, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLP) concentrations in seminal plasma: SLPI restores sperm motility reduced by elastase. *Mol Hum Reprod*. 1998;4:946-950.
110. Moriyama A, Shimoya K, Ogata I, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) concentrations in cervical mucus of women with normal menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*. 1999;5:656-661.
111. Ohlsson K, Bjartell A, Lilja H. Secretory leukocyte protease inhibitor in the male genital tract: PSA-induced proteolytic processing in human semen and tissue localization. *J Androl*. 1995;16:64-74.
112. De Water R, Willems LN, Van Muijen GN, et al. Ultrastructural localization of bronchial antileukoprotease in central and peripheral human airways by a gold-labeling technique using monoclonal antibodies. *Am Rev Respir Dis*. 1986;133:882-890.

113. Si-Tahar M, Merlin D, Sitaraman S, Madara JL. Constitutive and regulated secretion of secretory leukocyte proteinase inhibitor by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2000;118:1061-1071.
114. Wiedow O, Harder J, Bartels J, Streit V, Christophers E. Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;248:904-909.
115. Nystrom M, Bergenfeldt M, Ljungcrantz I, Lindeheim A, Ohlsson K. Production of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in human pancreatic beta-cells. *Mediators Inflamm*. 1999;8:147-151.
116. Ohlsson S, Ljungcrantz I, Ohlsson K, Segelmark M, Wieslander J. Novel distribution of the secretory leukocyte proteinase inhibitor in kidney. *Mediators Inflamm*. 2001;10:347-350.
117. Doumas S, Kolokotronis A, Stefanopoulos P. Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor. *Infect Immun*. 2005;73:1271-1274.
118. King AE, Morgan K, Sallenave JM, Kelly RW. Differential regulation of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin by progesterone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310:594-599.
119. Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;11:733-741.
120. Vogelmeier C, Hubbard RC, Fells GA, et al. Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor. *J Clin Invest*. 1991;87:482-488.
121. Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, et al. Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leukoprotease inhibitor. *J Biol Chem*. 2001;276:33345-33352.
122. Eisenberg SP, Hale KK, Heimdal P, Thompson RC. Location of the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor. *J Biol Chem*. 1990;265:7976-7981.
123. Ying QL, Kemme M, Simon SR. Functions of the N-terminal domain of secretory leukoprotease inhibitor. *Biochemistry*. 1994;33:5445-5450.
124. McNeely TB, Shugars DC, Rosendahl M, Tucker C, Eisenberg SP, Wahl SM. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription. *Blood*. 1997;90:1141-1149.
125. Tseng CC, Tseng CP. Identification of a novel secretory leukocyte protease inhibitor-binding protein involved in membrane phospholipid movement. *FEBS Lett*. 2000;475:232-236.
126. Ma G, Greenwell-Wild T, Lei K, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection. *J Exp Med*. 2004;200:1337-1346.
127. Pillay K, Coutosoudis A, Agadzi-Naqvi AK, Kuhn L, Coovadia HM, Janoff EN. Secretory leukocyte protease inhibitor in vaginal fluids and perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis*. 2001;183:653-656.
128. Hiemstra PS. Epithelial antimicrobial peptides and proteins: their role in host defence and inflammation. *Paediatr Respir Rev*. 2001;2:306-310.

129. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH. Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun.* 1996;64:4520-4524.
130. Tomee JF, Hiemstra PS, Heinzl-Wieland R, Kauffman HF. Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi. *J Infect Dis.* 1997;176:740-747.
131. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond).* 2006;110:21-35.
132. Taggart CC, Cryan SA, Weldon S, et al. Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *J Exp Med.* 2005;202:1659-1668.
133. Mulligan MS, Lentsch AB, Huber-Lang M, et al. Anti-inflammatory effects of mutant forms of secretory leukocyte protease inhibitor. *Am J Pathol.* 2000;156:1033-1039.
134. Ding A, Thieblemont N, Zhu J, Jin F, Zhang J, Wright S. Secretory leukocyte protease inhibitor interferes with uptake of lipopolysaccharide by macrophages. *Infect Immun.* 1999;67:4485-4489.
135. Zhu J, Nathan C, Jin W, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell.* 2002;111:867-878.
136. Ashcroft GS, Lei K, Jin W, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med.* 2000;6:1147-1153.
137. Kikuchi T, Abe T, Yaekashiwa M, et al. Secretory leukoprotease inhibitor augments hepatocyte growth factor production in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23:364-370.
138. Zhang D, Simmen RC, Michel FJ, Zhao G, Vale-Cruz D, Simmen FA. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates proliferation of human endometrial epithelial cells by positive and negative regulation of growth-associated genes. *J Biol Chem.* 2002;277:29999-30009.
139. Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholt K, Dano K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:667-671.
140. Dodwell DJ. Proteinase inhibitors in malignancy: therapeutic promise or another white elephant? *J R Soc Med.* 1993;86:573-576.
141. Seftor RE, Seftor EA, Sheng S, Pemberton PA, Sager R, Hendrix MJ. maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma. *Cancer Res.* 1998;58:5681-5685.
142. Kobayashi H, Shinohara H, Fujie M, et al. Inhibition of metastasis of Lewis lung carcinoma by urinary trypsin inhibitor in experimental and spontaneous metastasis models. *Int J Cancer.* 1995;63:455-462.
143. Ohkoshi M, Akagawa T, Nakajima M. Effects of serine protease inhibitor FOY-305 and heparin on the growth of squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 1993;13:963-966.
144. Inada M, Yamashita J, Nakano S, Ogawa M. Complete inhibition of spontaneous pulmonary metastasis of human lung carcinoma cell line EBC-1 by a neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046.Na). *Anticancer Res.* 1998;18:885-890.

145. Higashiyama M, Doi O, Yokouchi H, Kodama K, Nakamori S, Tateishi R. Alpha-1-antichymotrypsin expression in lung adenocarcinoma and its possible association with tumor progression. *Cancer*. 1995;76:1368-1376.
146. Muller-Pillasch F, Wallrapp C, Bartels K, et al. Cloning of a new Kunitz-type protease inhibitor with a putative transmembrane domain overexpressed in pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1395:88-95.
147. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, et al. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2000;60:6281-6287.
148. Kataoka H, Uchino H, Iwamura T, Seiki M, Nabeshima K, Koono M. Enhanced tumor growth and invasiveness in vivo by a carboxyl-terminal fragment of alpha1-proteinase inhibitor generated by matrix metalloproteinases: a possible modulatory role in natural killer cytotoxicity. *Am J Pathol*. 1999;154:457-468.
149. Tsuchiya H, Katsuo S, Matsuda E, et al. The antibody to plasminogen activator inhibitor-1 suppresses pulmonary metastases of human fibrosarcoma in athymic mice. *Gen Diagn Pathol*. 1995;141:41-48.
150. Suminami Y, Nagashima S, Murakami A, et al. Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells. *Cancer Res*. 2001;61:1776-1780.
151. Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, et al. Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Res*. 2003;63:8614-8622.
152. Jarzab B, Wiench M, Fujarewicz K, et al. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Res*. 2005;65:1587-1597.
153. Rein DT, Breidenbach M, Nettelbeck DM, et al. Evaluation of tissue-specific promoters in carcinomas of the cervix uteri. *J Gene Med*. 2004;6:1281-1289.
154. Israeli O, Goldring-Aviram A, Rienstein S, et al. In silico chromosomal clustering of genes displaying altered expression patterns in ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;160:35-42.
155. Sriuranpong V, Mutirangura A, Gillespie JW, et al. Global gene expression profile of nasopharyngeal carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. *Clin Cancer Res*. 2004;10:4944-4958.
156. Liang G, Gonzales FA, Jones PA, Orntoft TF, Thykjaer T. Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res*. 2002;62:961-966.
157. Hu Y, Sun H, Drake J, et al. From mice to humans: identification of commonly deregulated genes in mammary cancer via comparative SAGE studies. *Cancer Res*. 2004;64:7748-7755.
158. Kluger HM, Kluger Y, Gilmore-Hebert M, et al. cDNA microarray analysis of invasive and tumorigenic phenotypes in a breast cancer model. *Lab Invest*. 2004;84:320-331.
159. Devoogdt N, Revets H, Ghassabeh GH, De Baetselier P. Secretory leukocyte protease inhibitor in cancer development. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1028:380-389.

160. Ameshima S, Ishizaki T, Demura Y, Imamura Y, Miyamori I, Mitsuhashi H. Increased secretory leukoprotease inhibitor in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2000;89:1448-1456.
161. Zelvyte I, Wallmark A, Piitulainen E, Westin U, Janciauskiene S. Increased plasma levels of serine proteinase inhibitors in lung cancer patients. *Anticancer Res*. 2004;24:241-247.
162. Devoogdt N, Hassanzadeh Ghassabeh G, Zhang J, Brys L, De Baetselier P, Revets H. Secretory leukocyte protease inhibitor promotes the tumorigenic and metastatic potential of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5778-5782.
163. Tsukishiro S, Suzumori N, Nishikawa H, Arakawa A, Suzumori K. Use of serum secretory leukocyte protease inhibitor levels in patients to improve specificity of ovarian cancer diagnosis. *Gynecol Oncol*. 2005;96:516-519.
164. Li S, Ross DT, Kadin ME, Brown PO, Wasik MA. Comparative genome-scale analysis of gene expression profiles in T cell lymphoma cells during malignant progression using a complementary DNA microarray. *Am J Pathol*. 2001;158:1231-1237.
165. Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, et al. Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy. *Cancer Res*. 2004;64:8558-8565.
166. Tian X, Shigemasa K, Hirata E, et al. Expression of human kallikrein 7 (hK7/SCCE) and its inhibitor antileukoprotease (ALP/SLPI) in uterine endocervical glands and in cervical adenocarcinomas. *Oncol Rep*. 2004;12:1001-1006.
167. Taggart CC, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill S. Secretory leucoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide-induced IkappaBalpha degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination. *J Biol Chem*. 2002;277:33648-33653.
168. Wang N, Thuraingam T, Fallavollita L, Ding A, Radzioch D, Brodt P. The secretory leukocyte protease inhibitor is a type 1 insulin-like growth factor receptor-regulated protein that protects against liver metastasis by attenuating the host proinflammatory response. *Cancer Res*. 2006;66:3062-3070.
169. Sugino T, Yamaguchi T, Ogura G, et al. The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) suppresses cancer cell invasion but promotes blood-borne metastasis via an invasion-independent pathway. *J Pathol*. 2007;212:152-160.
170. Sugino T, Kusakabe T, Hoshi N, et al. An invasion-independent pathway of blood-borne metastasis: a new murine mammary tumor model. *Am J Pathol*. 2002;160:1973-1980.
171. Nakamura K, Takamoto N, Hongo A, et al. Secretory leukoprotease inhibitor inhibits cell growth through apoptotic pathway on ovarian cancer. *Oncol Rep*. 2008;19:1085-1091.
172. Puck TT, Marcus PI, Cieciura SJ. Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J Exp Med*. 1956;103:273-283.
173. Alonso DF, Farias EF, Urtreger A, Ladeda V, Vidal MC, Bal De Kier Joffe E. Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J Surg Oncol*. 1996;62:288-297.
174. Brattain MG, Strobel-Stevens J, Fine D, Webb M, Sarrif AM. Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Res*. 1980;40:2142-2146.

175. Urtreger AJ, Diament MJ, Ranuncolo SM, et al. New murine cell line derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes. *Int J Oncol.* 2001;18:639-647.
176. Maffia PC, Zittermann SE, Scimone ML, et al. Neutrophil elastase converts human immature dendritic cells into transforming growth factor-beta1-secreting cells and reduces allostimulatory ability. *Am J Pathol.* 2007;171:928-937.
177. Kawase I, Urdal DL, Brooks CG, Henney CS. Selective depletion of NK cell activity in vivo and its effect on the growth of NK-sensitive and NK-resistant tumor cell variants. *Int J Cancer.* 1982;29:567-574.
178. Wright CD, Kennedy JA, Zitnik RJ, Kashem MA. Inhibition of murine neutrophil serine proteinases by human and murine secretory leukocyte protease inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254:614-617.
179. Ashkenazi A, Herbst RS. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest.* 2008;118:1979-1990.
180. Wang S. The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene.* 2008;27:6207-6215.
181. Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris AL, Gatter KC. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer.* 1996;73:148-153.
182. Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev.* 2008;222:206-221.
183. Chaput N, Conforti R, Viaud S, Spatz A, Zitvogel L. The Janus face of dendritic cells in cancer. *Oncogene.* 2008;27:5920-5931.
184. Yang J, Zhu J, Sun D, Ding A. Suppression of macrophage responses to bacterial lipopolysaccharide (LPS) by secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) is independent of its anti-protease function. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1745:310-317.
185. Gomez SA, Arguelles CL, Guerrieri D, et al. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor: A Secreted Pattern-recognition Receptor for Mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008.
186. Peltier MR, Liu WJ, Hansen PJ. Regulation of lymphocyte proliferation by uterine serpin: interleukin-2 mRNA production, CD25 expression and responsiveness to interleukin-2. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000;223:75-81.
187. Alkemade HA, van Vlijmen-Willems IM, van Haelst UJ, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J. Demonstration of skin-derived antileukoprotease (SKALP) and its target enzyme human leukocyte elastase in squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 1994;174:121-129.
188. Westin U, Nystrom M, Ljungcrantz I, Eriksson B, Ohlsson K. The presence of elafin, SLPI, IL1-RA and STNFalpha RI in head and neck squamous cell carcinomas and their relation to the degree of tumour differentiation. *Mediators Inflamm.* 2002;11:7-12.
189. Cheng WL, Wang CS, Huang YH, et al. Overexpression of a secretory leukocyte protease inhibitor in human gastric cancer. *Int J Cancer.* 2008;123:1787-1796.
190. Dong QG, Sclabas GM, Fujioka S, et al. The function of multiple IkappaB : NF-kappaB complexes in the resistance of cancer cells to Taxol-induced apoptosis. *Oncogene.* 2002;21:6510-6519.

191. Lunt SJ, Chaudary N, Hill RP. The tumor microenvironment and metastatic disease. *Clin Exp Metastasis*. 2008.
192. Hirose K, Hakozaiki M, Nyunoya Y, et al. Chemokine gene transfection into tumour cells reduced tumorigenicity in nude mice in association with neutrophilic infiltration. *Br J Cancer*. 1995;72:708-714.
193. de Vries EG, Timmer T, Mulder NH, et al. Modulation of death receptor pathways in oncology. *Drugs Today (Barc)*. 2003;39 Suppl C:95-109.
194. Kruyt FA. TRAIL and cancer therapy. *Cancer Lett*. 2008;263:14-25.
195. Sheikh MS, Huang Y. Death receptors as targets of cancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets*. 2004;4:97-104.
196. Hiemstra PS. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochem Soc Trans*. 2002;30:116-120.
197. Mader JS, Hoskin DW. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs*. 2006;15:933-946.
198. Risso A, Zanetti M, Gennaro R. Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity. *Cell Immunol*. 1998;189:107-115.
199. Risso A, Braidot E, Sordano MC, et al. BMAP-28, an antibiotic peptide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol*. 2002;22:1926-1935.
200. Lichtenstein AK, Ganz T, Nguyen TM, Selsted ME, Lehrer RI. Mechanism of target cytolysis by peptide defensins. Target cell metabolic activities, possibly involving endocytosis, are crucial for expression of cytotoxicity. *J Immunol*. 1988;140:2686-2694.
201. Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood*. 1986;68:1407-1410.
202. Mader JS, Salsman J, Conrad DM, Hoskin DW. Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther*. 2005;4:612-624.
203. Eliassen LT, Berge G, Leknessund A, et al. The antimicrobial peptide, lactoferricin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells in vitro and inhibits xenograft growth in vivo. *Int J Cancer*. 2006;119:493-500.