

Tesis Doctoral

# Efecto inmunomodulador del inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias (SLPI)

Guerrieri, Diego

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Guerrieri, Diego. (2010). Efecto inmunomodulador del inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias (SLPI). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Guerrieri, Diego. "Efecto inmunomodulador del inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias (SLPI)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

**EFFECTO INMUNOMODULADOR DEL  
INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASAS LEUCOCITARIAS  
(SLPI)**

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

**DIEGO GUERRIERI**

Director: Dr. H. Eduardo Chuluyan  
Consejero de Estudios: Dra. Rosa Wainstok

Lugar de Trabajo: 3° Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina,  
Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2010

**A Marianela**

## AGRADECIMIENTOS

\*A Marianela. Por ser mi compañera y tener siempre una palabra de aliento en todos mis proyectos. Uno puede hacer todo cuando comparte la vida con una de esas personas que son verdaderos tesoros, estrellas que valen por constelaciones enteras.

\*A toda mi familia que siempre me acompaña y apoya en mis decisiones. A mi mamá por mantener siempre su espíritu crítico y despertarme el deseo de aprender. A mi viejo por haberme permitido elegir con total libertad mi camino en la vida. A mis hermanos María, Martín y Gustavo por tantos juegos compartidos.

\*A mis compañeros del laboratorio. A July, Maca, Xime, Sonia, Mercedes, Nico, Nancy y Paulo. Gracias por la ayuda y la buena onda en el trabajo. Por las charlas de Ropa vs. Fútbol. A Mabel y Leo por la ayuda para resolver las cosas de todos los días.

\* Al Dr. Eduardo Chuluyan, por haberme permitido crecer en la investigación. Gracias por los consejos y la dirección durante la realización de esta tesis.

\*Al Dr. Horacio Romeo por su ayuda en la realización de los experimentos *in vivo*.

\*Al Dr. Rodolfo Rothlin y su grupo de trabajo por abrirnos las puertas de la 3° Cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina.

\*A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por los subsidios otorgados para poder desarrollar mi tesis.

\* A la Universidad de Buenos Aires que me otorgó la beca con la que puede realizar este doctorado.

## **ABREVIATURAS**

**Ac:** Anticuerpo

**ANOVA:** Análisis de varianza

**CDs:** Células dendríticas

**CML:** Cultivo mixto linfocitario

**CMSP:** Células mononucleares de sangre periférica

**CPA:** Célula Presentadora de Antígeno

**C.P.M:** Cuentas por minuto

**DO:** Densidad óptica

**DS:** Desvio Estándar

**EPOC:** Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

**ESM:** Error estándar de la media

**FACS:** Citometría de flujo

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**IFN- $\gamma$ :** Interferón  $\gamma$

**IL:** Interleuquina

**IP:** Ioduro de propidio

**LT:** Linfocito T

**MCM:** medio condicionado de monocitos

**MCCDs:** medio condicionado de Células Dendríticas CDs

**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad

**PAMPs:** Patrones Moleculares Asociados a Patogenos

**PE:** Ficoeritrina

**PMNs:** Leucocitos polimorfonucleares

**PRRs:** Receptor de Reconocimiento de Patrones

**SBF:** Suero bovino fetal

**SLPI:** Inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento tumoral

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral

---

<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<hr/>	
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<hr/>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>8 -44</b>
<hr/>	
<b>1. RESPUESTA INMUNE</b>	<b>8-10</b>
Conceptos generales	8-10
<b>2. INMUNIDAD INNATA</b>	<b>10-14</b>
<b>2.1. Barreras naturales</b>	<b>10-11</b>
<b>2.2 Sustancias Microbidas</b>	<b>12-14</b>
<b>2.3. Componentes celulares de la inmunidad innata</b>	<b>15-25</b>
Neutrófilos	15-18
Monocitos	19-20
Macrófagos	20-21
Células Dendríticas	22-24
Otros componentes celulares de la Respuesta Inmune Innata	24-25
<b>3. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA</b>	<b>26-33</b>
<b>3.1. Componentes celulares</b>	<b>26</b>
<b>3.2. Activación T</b>	<b>27</b>
<b>3.3. Rol de la IL-2 en la activación linfocitaria</b>	<b>28-29</b>
<b>3.4. Mecanismos efectores de la respuesta inmune adaptativa</b>	<b>29-33</b>
<b>4. CONTROL DE LA RESPUESTA INMUNE</b>	<b>34-36</b>
<b>4.1. Homeostasis de la respuesta adaptativa</b>	<b>34-35</b>
<b>4.2. Homeostasis de la respuesta innata</b>	<b>35-36</b>
<b>5. EL SLPI COMO FACTOR DE LA RESPUESTA INMUNE</b>	<b>36-40</b>
<b>5.1 Características generales</b>	<b>36-38</b>
<b>5.2 Rol del SLPI en la respuesta inmune innata</b>	<b>38-40</b>
<b>5.3 Rol del SLPI en la respuesta inmune adaptativa</b>	<b>40</b>
<b>6. ALTERACION DE LA RESPUESTA INMUNE</b>	<b>41-43</b>
<b>7. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>44</b>

---

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>45 -64</b>
<b>1. OBTENCION DE SLPI RECOMBINANTE HUMANO</b>	<b>45-48</b>
1.1. Expresión de SLPI	45
1.2. Purificación de SLPI	45-46
1.3. Pureza del SLPI	46
1.4. Diálisis del SLPI y elusión por PolimixinaB	46
1.5. Actividad anti-serinoproteasa	47
1.6. Generación de SLPI inactivado	47
1.7. Cuantificación de la concentración de proteína	47-48
<b>2. OBTENCIÓN DE CELULAS Y MEDIOS CONDICIONADOS</b>	<b>48-51</b>
2.1. Aislamiento de CMSP	48
2.2. Aislamiento de monocitos	48-49
2.3. Generación de Células Dendríticas (CDs)	49-50
2.4. Selección negativa de linfocitos	50
2.5. Generación de medio condicionado de monocitos (MCM)	50
2.6 Generación de medio condicionado de CDs (MCCDs)	51
<b>3. CULTIVOS CELULARES</b>	<b>51-53</b>
3.1. Cultivo mixto linfocitario (CML)	51
3.2. Ensayos de proliferación celular	51-52
3.3. Estimulación con Antígeno MTB	52
3.4. Cultivo de CMSP con CDs alogénicas	53
<b>4. DETERMINACIÓN DE ANTIGENOS</b>	<b>53-55</b>
4.1. Anticuerpos monoclonales usados para citometría	53
4.2. Marcaciones de superficie	53-54
4.3. Marcaciones intracitoplasmáticas	54
4.4. Detección de células apoptóticas por Anexina V	54-55
4.5. Determinación de Citoquinas Th1/Th2	55

---

<b>5. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS POR ELISA</b>	<b>55-56</b>
<b>5.1. ELISA para la detección de IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>55-56</b>
<b>5.2. ELISA para TGF-<math>\beta</math>1</b>	<b>56</b>
<b>6. WESTERN BLOT</b>	<b>56-57</b>
<b>6.1. Detección de I<math>\kappa</math>B-<math>\alpha</math></b>	<b>56-57</b>
<b>6.2. Detección de T-bet y GATA-3</b>	<b>57</b>
<b>7. SISTEMA DE ENTRAMPAMIENTO DE SLPI</b>	<b>57-58</b>
<b>7.1. Preparación de microesferas conteniendo SLPI</b>	<b>57-58</b>
<b>7.2. Ensayos de liberación</b>	<b>58</b>
<b>7.3. Actividad biológica del SLPI atrapado</b>	<b>58</b>
<b>8. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i></b>	<b>58-61</b>
<b>8.1. Animales</b>	<b>58</b>
<b>8.2. Orquitis Autoinmune Experimental (EAO)</b>	<b>59</b>
<b>8.3. Obtención de esplenocitos y ganglios linfáticos de ratas</b>	<b>59-60</b>
<b>8.4. Proliferación celular</b>	<b>60</b>
<b>8.5. Modelos de hipersensibilidad retardada (HSR)</b>	<b>60</b>
<b>8.6. Modelo de trasplante de piel</b>	<b>61</b>
<b>9. ESTUDIOS CON MUESTRAS DE PACIENTES</b>	<b>61-63</b>
<b>9.1. Características de los pacientes y criterios</b>	<b>61-62</b>
<b>9.2. Proliferación de CMSP</b>	<b>63</b>
<b>9.3. ELISA para estudiar los niveles de SLPI</b>	<b>63</b>
<b>10. ANALISIS ESTADISTICO</b>	<b>64</b>



---

<b>RESULTADOS</b>	<b>65-105</b>
<hr/>	
<b>1. ACTIVIDAD DEL SLPI SOBRE LA REPUESTA INMUNE ADAPTATIVA</b>	<b>65-75</b>
<b>1.1. Efecto del SLPI sobre la proliferación linfocitaria</b>	<b>65-68</b>
<b>1.2. Efecto del SLPI sobre la activación linfocitaria</b>	<b>68-70</b>
<b>1.3. Efecto del SLPI sobre la diferenciación linfocitaria</b>	<b>70-75</b>
<b>2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL SLPI</b>	<b>75-87</b>
<b>2.1. Efecto del SLPI sobre los monocitos</b>	<b>75-79</b>
<b>2.2. Efecto sobre la secreción de citoquinas</b>	<b>79-82</b>
<b>2.3. Actividad del SLPI sobre Células dendríticas (CDs)</b>	<b>82-87</b>
<b>3. EFECTO DEL SLPI <i>IN VIVO</i></b>	<b>88-101</b>
<b>3.1. Efecto del SLPI en la Orquitis Autoinmune Experimental</b>	<b>88-89</b>
<b>3.2. Sistema de entrapamiento de SLPI</b>	<b>89-91</b>
<b>3.3. SLPI disminuye las lesiones en EAO</b>	<b>91-94</b>
<b>3.4. SLPI disminuye la HSR inducida por Ag testicular</b>	<b>94-95</b>
<b>3.5. SLPI disminuye la respuesta celular</b>	<b>95-97</b>
<b>3.6. Efecto del SLI en modelos de hipersensibilidad retardada</b>	<b>97-99</b>
<b>3.7. Efecto del SLPI en un modelo de trasplante de piel</b>	<b>99-101</b>
<b>4. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE SLPI Y PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y EPOC</b>	<b>101-105</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>106-117</b>
<hr/>	
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>118</b>
<hr/>	
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>119-128</b>
<hr/>	

## **EFFECTO INMUNOMODULADOR DEL INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASAS LEUCOCITARIAS (SLPI)**

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 la respuesta inmune. Los resultados obtenidos *in vitro* muestran que SLPI disminuye la proliferación linfocitaria inducida por IL-2, anti-CD3 y cultivos mixtos linfocitarios en forma dosis dependiente. El SLPI inhibe la activación linfocitaria disminuyendo los niveles de CD25 e inhibiendo la traslocación al núcleo de NF- $\kappa$ B. La inhibición sobre la proliferación no se observa en ausencia células mononucleares de sangre periférica (CMSP) depletadas de monocitos, y fue restituida en presencia de medio condicionado de monocitos pre-tratados con SLPI. Los monocitos tratados con SLPI producen altos niveles de IL-4, IL-6 e IL-10. Además, el SLPI inhibe la producción de IFN- $\gamma$  y T-bet inducidos por IL-2 y un lisado de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Por otro lado el SLPI disminuye la cantidad de células CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> y la secreción de TGF- $\beta$  inducida por la elastasa y aumenta los niveles de IL-17 e IL-6. Estos resultados sugieren que el SLPI modula la respuesta inmune adaptativa inhibiendo la diferenciación de las células hacia un patrón Th1, las Treg y favoreciendo el perfil Th2 y Th17. Sin embargo, en modelos murinos *in vivo*, la administración de SLPI parece tener un efecto anti-inflamatorio; dado que el SLPI fue capaz de limitar las lesiones en la orquitis autoinmune experimental. Este efecto modulador de la respuesta inmune también se pudo corroborar en pruebas de hipersensibilidad retardada y en trasplante de piel. Por otro lado, los niveles de SLPI plasmático y la capacidad linfoproliferativa fue examinada en donantes sanos, pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y pacientes con cáncer de pulmón. Se pudo probar la existencia de una correlación negativa entre la proliferación linfocitaria y los niveles plasmáticos de SLPI para pacientes con EPOC y cáncer de pulmón pero no así para los dadores sanos. Estos resultados muestran al SLPI como una molécula con capacidad inmunomoduladora y los niveles de SLPI plasmáticos podrían ser un índice indirecto de la capacidad linfoproliferativa en los pacientes con EPOC y cáncer de pulmón.

**Palabras claves: SLPI, Linfocitos, Monocitos, homeostasis**

## **IMMUNOMODULATOR EFFECT OF SECRETORY LEUKOCYTE PROTEASE INHIBITOR (SLPI)**

Human SLPI is an 11.7 kDa cationic non-glycosylated serine protease inhibitor constitutively produced in mucosal surfaces such as airway epithelium and human uterus, but can also be secreted by inflammatory cells. The aim of this work was to evaluate the function of SLPI in the immune response. Results obtained *in vitro* shows that SLPI decreased the lymphocyte proliferation induced by IL-2, anti-CD3 and mixed lymphocyte reaction (MLR) in a dose-dependent manner. SLPI inhibits lymphocyte activation by decreasing CD25 expression and avoiding I $\kappa$ B degradation. SLPI inhibition was not observed by depleting monocytes from PBMCs and it was restored by adding monocytes or culture supernatant. Monocytes treated with SLPI, produced IL-4, IL-6 and IL-10 and decreased the expression of IFN- $\gamma$ . Furthermore SLPI decreased CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> cells and TGF- $\beta$  production but increased IL-17 expression on lymphocytes. To determine the relevance of this effect *in vivo*, we investigated the immunoregulatory role of SLPI in an experimental autoimmune orchitis (EAO), delayed-type hypersensitivity models and in a skin transplantation model. SLPI significant decreased the EAO incidence. Even more the delayed-type hypersensitivity was reduced by SLPI and the allograft rejection was decreased. Furthermore, we evaluated a putative correlation between SLPI plasma levels and proliferation in healthy donors (HD; n =15), chronic obstructive pulmonary disease (COPD, n =17) and lung cancer (n = 23) patients. Plasma SLPI concentration was correlated with PBMC proliferation in COPD and lung cancer patients but not in HD. Our results demonstrated that SLPI has an immunomodulator effect on lymphocytes and that plasma SLPI concentration might be used as a marker of lymphocyte proliferation to follow up the immune status.

**Key Words: SLPI, lymphocytes, Monocytes, Homeostasis**

## INTRODUCCION

### 1. RESPUESTA INMUNE

#### Conceptos generales

El sistema inmune está 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 asesinas naturales (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 linfoides<sup>1</sup>.

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo y permite controlar 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 CDs y otros leucocitos, como las células NK, los linfocitos T (LT)  $\gamma\delta^2$  y los linfocitos B1 productores de anticuerpos naturales<sup>3</sup>.

Una de las propiedades claves de la respuesta inmune innata es que puede reconocer estructuras moleculares conservadas de microorganismos que son los PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos). Para lograr esto utiliza receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como los “Toll-like receptors” (TLR) que se encuentran en los macrófagos, monocitos, CDs, neutrófilos y células epiteliales y permiten el reconocimiento temprano de patógenos directamente en el sitio de la infección. El reconocimiento de estructuras o patrones moleculares conservadas por estos receptores envía una “señal de

peligro” al sistema inmune que activa mecanismos efectores no específicos, que llevan al establecimiento de un proceso inflamatorio. Sin embargo, el reconocimiento de antígenos derivados de los patógenos por los linfocitos T y B también activan la respuesta inmune adaptativa<sup>4</sup>. Las células clave en mediar la interacción entre la respuesta inmune innata y la adaptativa son las células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales, en particular las CDs, que detectan “señales de peligro” y se encuentran en casi todos los tejidos.

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 T específicos para el reconocimiento antigénico.

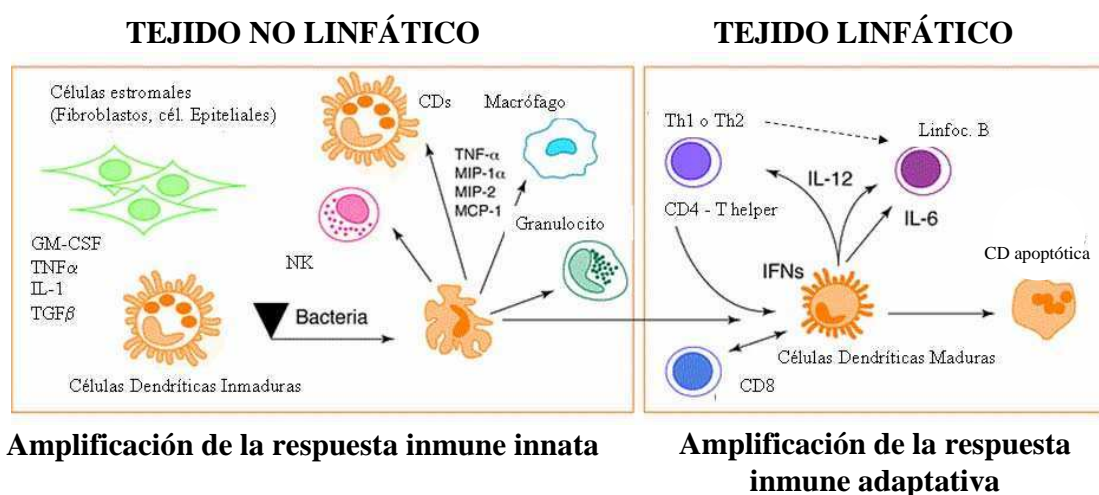
Las células que participan en la respuesta inmune se encuentran organizadas formando tejidos y órganos linfáticos. Es en estos órganos linfáticos donde los linfocitos pueden interactuar con células no linfoides que son importantes tanto para el desarrollo del sistema inmune como para la iniciación de la respuesta inmune. Los principales órganos linfoides se clasifican en primarios, donde se generan y maduran 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 en la médula ósea y posteriormente en el bazo.

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. 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.

El reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos requiere la intervención de las 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 y/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.

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 línea de defensa contra los agentes patógenos, sino que también juega varios roles importantes en la inducción y modulación de la respuesta inmune adaptativa (**Figura 1**).



**Figura 1. Células que participan en la respuesta inmune.** El sistema inmune consta de dos tipos de respuestas: la innata y la adaptativa. Las dos respuestas se encuentran íntimamente relacionadas.

## 2. INMUNIDAD INNATA

### 2.1. Barreras naturales

Se estima que una persona adulta posee 400 m<sup>2</sup> de superficie de mucosas. Ello brinda a los diferentes microorganismos patógenos una amplia área, expuesta al medio externo, potencialmente colonizable. Para hacer frente a este desafío, las mucosas ponen en juego un

amplio conjunto de mecanismos microbiostáticos y microbicidas propios tanto de la inmunidad innata como de la adquirida.

Los epitelios que recubren los tractos no presentan una organización única. En la cavidad oral, la faringe, el esófago, la uretra y la vagina el epitelio es estratificado. La mucosa intestinal está recubierta por un epitelio simple, mientras que las vías aéreas hay un epitelio simple o estratificado, de acuerdo con la región analizada. La continuidad del epitelio constituye una barrera formidable contra la penetración de microorganismos y macromoléculas potencialmente perjudiciales. Además de generar una barrera física que impide el paso de los microorganismos, las células epiteliales pueden inducir la iniciación de la respuesta inmune innata. Se ha demostrado que el cultivo de células epiteliales *in vitro* pueden aumentar la expresión inducible de péptidos antimicrobianos<sup>5,6,7,8</sup>. Luego de la exposición a LPS las vías aéreas demuestran una refractaridad mayor a ser colonizadas por bacterias<sup>9,10</sup>. Sin embargo, la resistencia que ejerce por ejemplo el epitelio pulmonar es totalmente local ya que no hay protección contra la inoculación intraperitoneal o intravenosa de bacterias<sup>11</sup>. Es notable que esta resistencia se puede inducir en ratones deficientes de neutrófilos, macrófagos, mastocitos, CD8, NK y linfocitos<sup>11</sup>. Se ha demostrado que las células epiteliales estimuladas con PAMPs o citoquinas pueden matar microorganismos directamente<sup>12,13</sup>. Esto se debe a que luego del estímulo con productos microbianos las células epiteliales aumentan la producción de múltiples péptidos antimicrobianos. Estos péptidos antimicrobianos producidos por las células epiteliales limitan la sobrevivencia de los patógenos generalmente al aumentar su permeabilidad por la disrupción de la pared y la membrana celular. Además, se ha descrito que en respuesta a una infección o herida, las células epiteliales producen gran cantidad de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas como TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, GM-CSF, CXCL5 y leucotrienos lo que permite el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos, monocitos y NK<sup>14,15,16</sup>. Además de eliminar patógenos y reclutar células de la respuesta innata el epitelio también direcciona la naturaleza de la respuesta inmune adaptativa. Por ejemplo, en respuesta a ciertos virus, helmintos o alérgenos, agonistas de TLR las células epiteliales producen linfopoyetina del estroma tímico<sup>17</sup>, IL-25, GM-CSF, IL-33 que promueven un reclutamiento selectivo de CD8 y una desviación de la respuesta inmune adaptativa hacia un perfil Th2<sup>16,18</sup>.

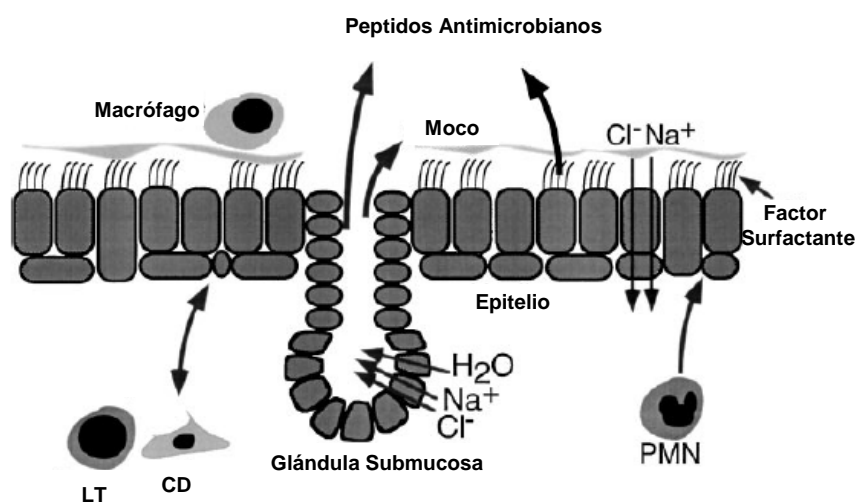
## 2.2. Sustancias Microbidas

Durante el curso de una infección, la respuesta inmune innata controla la propagación de los microorganismos pero muchas veces es la posterior respuesta inmune adaptativa a través de los linfocitos T la que logra la contención y/o eliminación del patógeno. Por lo tanto, la evolución de un individuo expuesto a un patógeno está determinada por varios factores que incluyen el acervo genético y la especificidad y fortaleza de los mecanismos de defensa montados contra el patógeno. El sistema inmune innato del hospedador es capaz de detectar PAMPs que son estructuras moleculares conservadas producidas exclusivamente por los microorganismos que son esenciales para el funcionamiento de los mismos<sup>19</sup>. El reconocimiento por los PRRs facilita la fagocitosis del patógeno o genera las señales necesarias para la inducción de una adecuada respuesta inmune<sup>20</sup>. La coevolución de los patógenos y el hospedador ha llevado a la generación de un grupo diverso de péptidos producidos por el hospedador con la capacidad de matar a los patógenos. Estas moléculas llamadas péptidos antimicrobianos (AMPs) se encuentran prácticamente en todas las formas de vida; en organismos como las bacterias o en plantas y también en invertebrados y en vertebrados incluyendo a los mamíferos. Entre este último grupo, los humanos presentan varios tipos celulares que sintetizan y secretan AMPs, como las células epiteliales, los queratinocitos, los neutrófilos, macrófagos y NK. Estos péptidos pueden ser considerados como parte de la respuesta inmune innata. Tienen la capacidad de unirse y matar a los patógenos pero todavía no es claro como la mayoría de estos péptidos se unen a los PAMPs y como facilitan la fagocitosis por parte de los macrófagos. Por lo tanto, no se sabe si la mayoría de los AMPs pueden ser considerados PRR. Algunos AMPs se expresan de forma constitutiva pero otros son sintetizados luego de producidas las señales de infección tanto de mediadores exógenos como endógenos<sup>21,22</sup>.

Clásicamente los AMPs son péptidos cortos, altamente catiónicos, con un diverso repertorio de actividades dentro del sistema inmune innato. Estos polipéptidos son capaces de aumentar la fagocitosis, estimular la liberación de prostaglandinas, neutralizar los efectos sépticos del LPS, promover el reclutamiento y acumulación de diversas células del sistema inmune al foco inflamatorio<sup>23</sup>, entre muchas otras funciones. En los últimos años, estas moléculas comenzaron a ser consideradas como una posible alternativa para el manejo de procesos infecciosos. Hasta el momento, más de 1400 AMPs han sido



descubiertos y descritos en numerosas especies (ver base de datos de péptidos antimicrobianos: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). La clasificación de estos péptidos tomando en cuenta la homología estructural de motivos permite describir dos familias para los AMPs de origen eucariota: los AMPs catiónicos y los no catiónicos<sup>24</sup>. El primer grupo es el más grande e incluye a las defensinas, catelicidinas y a las serpinas como el elafin y el Inhibidor Secretorio de Proteasas Leucocitario (SLPI), el cual será tratado en detalle más adelante (Figura 2).



**Figura 2. Defensas del epitelio pulmonar.** Además de la secreción de líquido surfactante, las células epiteliales y las glándulas submucosas secretan moco y péptidos antimicrobianos como las defensinas, catelicidinas y las serpinas como el elafin y el SLPI.

Los AMPs son mayoritariamente péptidos que presentan una gran flexibilidad conformacional y diversas estructuras secundarias, estas características les permiten insertarse en biomembranas logrando la disrupción de la integridad. En general, los péptidos catiónicos interfieren la integridad de la membrana bacteriana formando canales iónicos que aumentan la permeabilidad de la membrana y que finalmente llevan a la lisis de la célula bacteriana.

En las bacterias Gram positivas se ha demostrado que varios péptidos se unen a lipopolisacáridos de la pared bacteriana y en bacterias Gram negativas estos péptidos pueden permeabilizar la membrana externa promoviendo su propia incorporación<sup>25</sup>. A pesar que algunos péptidos pueden ser considerados antibióticos naturales por su alta concentración en sitios específicos, muchos otros AMPs presentan una baja actividad microbicida en las condiciones fisiológicas en las que se encuentran. Sin embargo, a pesar que los AMPs ganaron importancia originalmente por sus funciones antimicrobianas actuando de forma directa<sup>26</sup>, hoy se sabe que muchos de estos péptidos catiónicos no actúan de esta forma. Por el contrario, en ciertas condiciones, se han descrito un gran número de nuevas funciones en el contexto de la respuesta inmune para estos péptidos.

Algunos AMPs están involucrados en la transición hacia la respuesta inmune adaptativa, ya que se ha demostrado que son factores quimiotácticos para monocitos<sup>27</sup> y células T<sup>25</sup> y además pueden modular la diferenciación de CD4 y modificar la inducción de la polarización de células T efectoras<sup>28</sup>. Sin embargo, algunos de estos péptidos son capaces de funcionar como factores de control por retroalimentación negativa que facilitan la resolución de los procesos inflamatorios<sup>29</sup>. Por lo tanto, es posible que un mal funcionamiento de estos sistemas de control, por ejemplo una falla en la producción de los péptidos, puedan ser los responsables de amplificar y perpetuar los procesos inflamatorios. Como se ha descrito, el rol de los AMPs en la inmunidad innata y los blancos en los patógenos ha sido muy bien estudiada. Sin embargo, todavía no se sabe cómo estos AMPs modifican la fisiología de la respuesta inmune adaptativa. En particular no se ha descrito con claridad como intervienen en la respuesta de las células T y este es un punto muy importante ya que una respuesta T colaboradora adecuada, por ejemplo Th1 y Th2, frente a patógenos intracelulares y extracelulares respectivamente, permitirá la resolución o la perpetuación de los procesos inflamatorios.

## 2.3. Componentes celulares de la inmunidad innata

### Neutrófilos

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) se originan a partir de un grupo de células progenitoras presentes en la medula ósea, no destinadas exclusivamente a la producción de neutrófilos. En sangre los neutrófilos se encuentran distribuidos en un “pool” circulante, presente en los grandes vasos sanguíneos y un “pool” marginal que comprende granulocitos arrestados transitoriamente en capilares estrechos, sobre todo pulmonares. Ante la presencia de estímulos proinflamatorios, el endotelio de los vasos que irrigan el tejido inflamado sufre modificaciones en el patrón de expresión de moléculas de adhesión que constituyen las señales desencadenante de la adhesión de los neutrófilos al endotelio, los cuales se extravasan posteriormente en respuesta a estímulos quimiotácticos. A medida que los neutrófilos llegan al sitio de inflamación para eliminar a los agentes patógenos, provocan un aumento de LTB<sub>4</sub> e IL-8 incrementando el reclutamiento de leucocitos al foco inflamatorio. Además, factores liberados por los neutrófilos pueden clivar al factor 5 del complemento liberando a C5a<sup>30</sup> que también es un quimioattractante.

El neutrófilo cuenta con distintos receptores de reconocimiento para poder desplegar su potencial microbicida. Ellos son los receptores para componentes del complemento (CR1; CR3; CR4), los receptores para la porción Fc de la cadena  $\gamma$  (RFc $\gamma$ IIA y RFc $\gamma$ IIIb) y los receptores de tipo Toll (TLR1; TLR2; TLR4; TLR5). A través de estos receptores los neutrófilos reconocen como extraños a los microorganismos y desencadenan respuestas que contribuyen a controlar la infección.

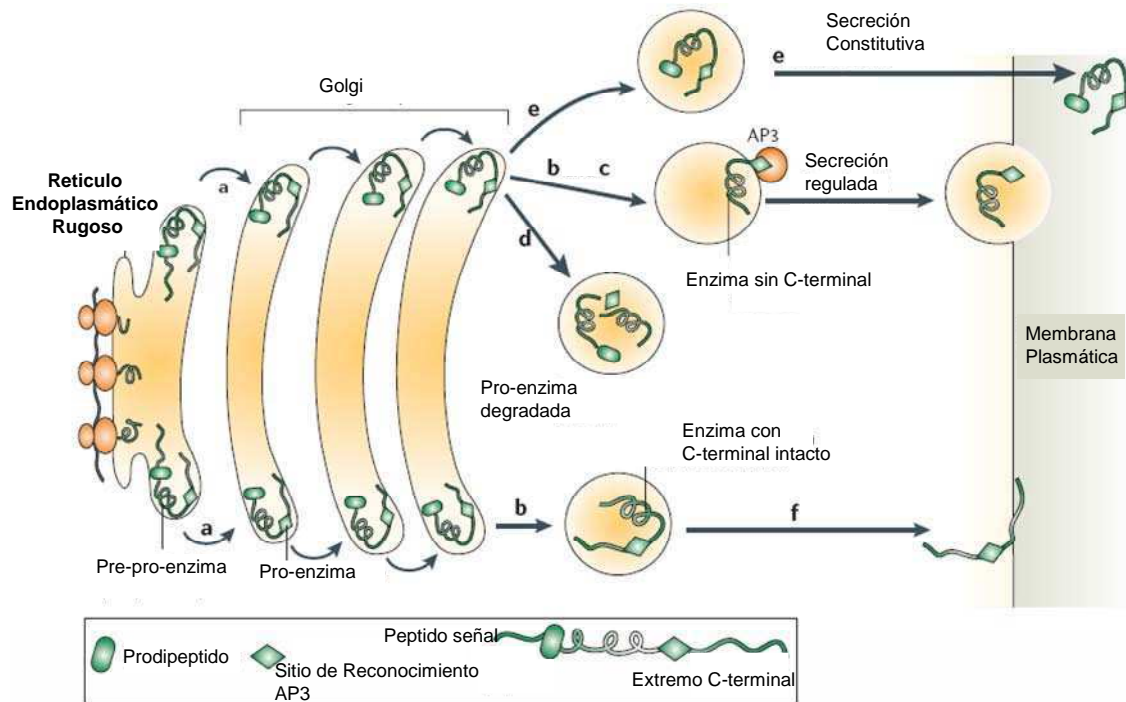
Cuando el neutrófilo entra en contacto con el microorganismo patógeno, lo envuelve mediante pseudópodos, dando origen a una vacuola fagocítica o fagosoma. Simultáneamente, los lisosomas primarios se unen al fagosoma dando origen al fagolisosoma; dentro del mismo el microorganismo es sometido a la acción 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<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), anión hipoclorito (ClO<sup>-</sup>), radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>), oxígeno singulete (1O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 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 péptidos catiónicos, otras proteínas bactericidas y proteasas.

Los neutrófilos contienen al menos los siguiente cuatro tipos de gránulos: gránulos azurófilos (también conocidos como primarios), gránulos específicos (también conocidos como secundarios), gránulos de gelatinasa (conocidos como terciarios) y gránulos secretorios<sup>31</sup>. Los gránulos se clasifican de acuerdo a su contenido proteico y su capacidad para ser exocitados luego de la activación del neutrófilo frente a un estímulo inflamatorio.

Los gránulos azurófilos presentan poca exocitosis y se cree que están relacionados con la degradación intracelular de microorganismos en el fagolisosoma. Estos gránulos azurófilos presentan gran cantidad de mieloperoxidasa (MPO), proteína que incrementa la permeabilidad bacteriana (BPI), defensinas y proteasas como elastasa, catepsina G y proteinasa 3. A pesar de que se ha demostrado hace tiempo que estas serinoproteasas poseen actividad antimicrobiana *in vitro*, la importancia de esta actividad microbicida *in vivo* sólo se ha demostrado recientemente. La generación de ratones deficientes en elastasa demostró que esta proteasa es requerida para la eliminación de ciertas bacterias Gram negativas<sup>32</sup>. Además, la elastasa y la catepsina G contribuyen a la protección contra ciertas infecciones fungicas<sup>33</sup>. La elastasa pertenece a una clase de serino proteasas que presentan un alto grado de homología a nivel de cDNA y secuencia de aminoácidos con las granzimas presentes en los linfocitos T citotóxicos, y con la quimasa y triptasa de los mastocitos. Todas las serino proteasas de esta clase contienen histidina, ácido aspártico y serina en la triada catalítica de la enzima. El gen que codifica para la elastasa se encuentra en el cromosoma 19 en humanos y en el cromosoma 10 en ratones<sup>34</sup>. La elastasa neutrofilica es sintetizada como un zimógeno que requiere dos procesamientos separados del extremo amino terminal para formar la enzima activa. Rápidamente, luego de la síntesis, el péptido señal es removido por una peptidasa dejando en el extremo N-terminal una prosequencia de dos residuos de aminoácidos. La remoción de este prodipéptido ocurre durante el transporte hacia los gránulos y requiere la actividad de la dipeptidil peptidasa (DPPI) conocida como Catepsina C<sup>35</sup>. El mismo proceso que sufren las granzimas y las quimasas. La elastasa sufre además el procesamiento de su extremo C-terminal. A pesar que el procesamiento del extremo C-terminal no se requiere para obtener una enzima activa, este procesamiento es necesario para direccionar a la elastasa hacia los gránulos<sup>36</sup> (Figura 3). Se ha demostrado

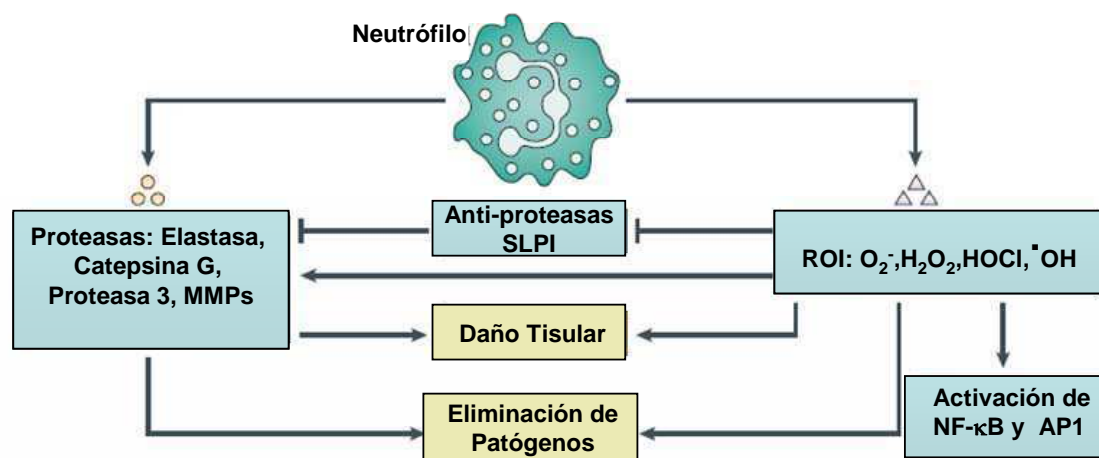
que el procesamiento del extremo C-terminal expone un sitio de acople que permite la interacción de la elastasa con la proteína adaptadora AP3. AP3 es una proteína cargo responsable del tráfico de las proteínas desde el trans-Golgi hacia los gránulos<sup>37,38</sup>.



**FIGURA 3. Tráfico intracelular de las serinoproteasas.** Las proteasas se sintetizan como pre-pro-enzima y son procesadas por una peptidasa en el Golgi para formar una pro-enzima. A través del Golgi la pro-enzima es procesada por la dipeptidil peptidasa I (DPPI) que cliva el prodipeptido. Luego pasa a los gránulos donde una proteasa cliva el C-terminal que permite a la enzima interactuar con AP3 y se almacena en los gránulos donde espera la señal adecuada para la secreción. En ausencia del DPPI, la proenzima es degradada (d) secretada constitutivamente (e). Si el C-terminal queda intacto, no se produce interacción con AP3 y la enzima es llevada a la superficie celular (b, f).

La elastasa, como la proteinasa 3, clivan preferentemente después de residuos de valina<sup>39</sup>. Sin embargo, esta proteasa tiene un amplio rango de sustratos, incluyendo a la mayoría de las proteínas que forman parte de la matriz extracelular (ECM). En condiciones normales la actividad extracelular es inhibida por las serpinas que son los inhibidores endógenos de las serino proteasas. De esta forma la elastasa puede ser inhibida por  $\alpha$ 1-antitripsina, elafin y SLPI<sup>40</sup>. Las serpinas funcionan presentando un sitio ideal como sustrato para la proteasa, esto lleva a una reacción que atrapa a la enzima y distorsiona el sitio catalítico de la proteasa inactivándola<sup>41</sup>. El rol del SLPI será descrito en profundidad más adelante en este trabajo.

Las serino proteasas producidas por el neutrófilo pueden generar proteólisis extracelular a pesar de la presencia de inhibidores. Algunos estudios indican que la gran cantidad de oxidantes y proteasas liberadas por los leucocitos en el foco inflamatorio pueden sobrepasar e inactivar a las serpinas causando daño tisular<sup>42</sup> (Figura 4).



**FIGURA 4 . La función del neutrófilo.** El bloqueo de las serino proteasas puede ser efectivo para detener el daño tisular. Sin embargo las anti-proteasas pueden ser inactivadas por los productos derivados del metabolismo del  $O_2$ .

## Monocitos

Los monocitos representan el 10% de los leucocitos que circulan por la sangre en los humanos y el 4% en ratones. Estas células juegan un rol importante en el desarrollo y la homeostasis del cuerpo ya que pueden remover células apoptóticas y eliminar compuestos tóxicos<sup>43,44</sup>. La función más conocida de los monocitos es la de ser un reservorio de los precursores mieloides para la renovación en los tejidos de los macrófagos y CDs residentes<sup>45,46,47</sup>. Sin embargo, los monocitos en sangre periférica cumplen diversas funciones en procesos inflamatorios<sup>48</sup>. Los monocitos tienen varios receptores *scavenger* que los permite reconocer microorganismos o células apoptóticas y producir en consecuencia grandes cantidades de moléculas efectoras<sup>49, 50, 51</sup>. La inflamación producida por infecciones tiene un profundo efecto sobre el número de monocitos en la sangre. Estos estímulos generan un aumento en el número de monocitos que egresan de la médula ósea<sup>52</sup>. En humanos los monocitos presentan una morfología típica con una forma irregular, un núcleo oval, con vesículas en el citoplasma y una alta relación citoplasma/núcleo. A pesar de ello, son muy heterogéneos en cuanto a su tamaño y forma y resulta difícil distinguirlos por morfología de células NK, CDs de sangre periférica o linfocitos activados. En los últimos 25 años, han surgido muchas evidencias que demuestran que el rol de los monocitos en los procesos inflamatorios fisiopatológicos puede ser explicado por la existencia de subpoblaciones en los monocitos de sangre periférica. Los monocitos humanos se caracterizan por la expresión de Csf-1r (CD115) y el receptor CX3CR1 y por la ausencia de CD3, CD19 o CD15. En años recientes los investigadores han identificado distintas subpoblaciones de monocitos de sangre periférica en humanos; dos de estas subpoblaciones hoy se consideran CDs y otras tres subpoblaciones han mantenido la denominación de monocitos definidas por la presencia de CD14 y CD16<sup>53, 54</sup>. Dentro de estos monocitos, las células CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> representan el 80-90% de los monocitos en sangre periférica y expresan altos niveles de CCR2 y bajos niveles de CX3CR1 mientras que producen IL-10 en respuesta a LPS *in vitro*<sup>55, 56</sup>. En contraste las células CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> expresan altos niveles de CX3CR1 y bajos niveles de CCR2 y producen TNF- $\alpha$  en respuesta a LPS y son llamados monocitos proinflamatorios<sup>57</sup>. Muchos estudios muestran que en pacientes con inflamación aguda<sup>58</sup> o enfermedades infecciosas<sup>59,60</sup> estos monocitos CD16<sup>+</sup> se encuentran en mayor cantidad en la sangre. Resulta interesante señalar que estos

monocitos CD16<sup>+</sup> disminuyen su presencia frente al tratamiento con glucocorticoides<sup>59</sup>. Sin embargo, dentro de este grupo CD16<sup>+</sup> existe un subgrupo que expresa bajos niveles de CD14. Esta subpoblación CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> no producen TNF- $\alpha$  o IL-1 en respuesta a LPS<sup>61</sup> (Tabla 1).

MONOCITOS	I	II	III
% de población en SP	80-90	5-10	5-10
CD14	+	+	-
CD16	-	+	+
CCR2	+	-	¿?
CX3CR1	-	+	¿?
Rta. a LPS	IL-10	TNF- $\alpha$ , IL-1	¿?

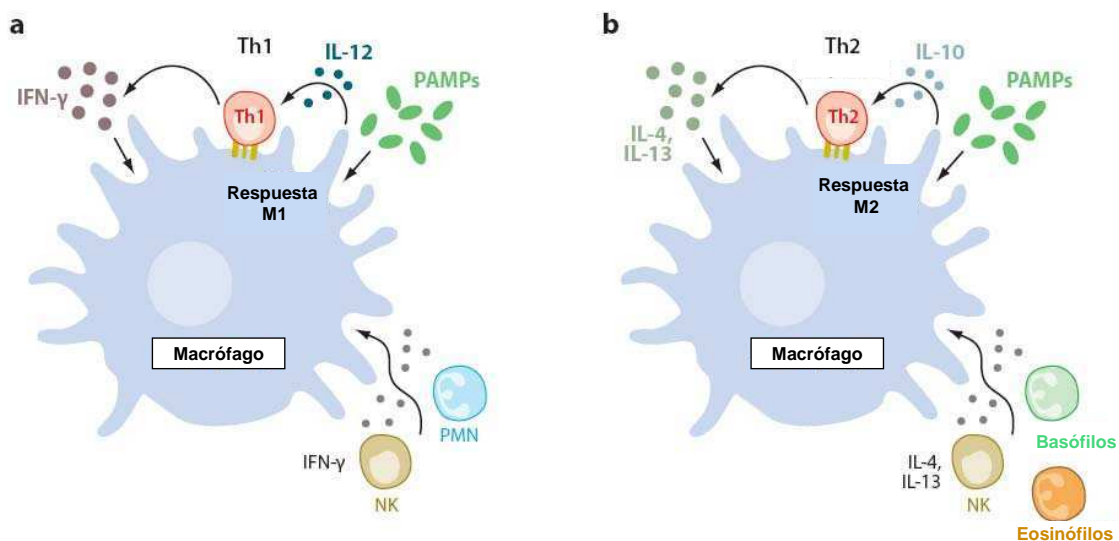
**Tabla 1.** Expresión diferencial de moléculas de superficie y expresión de citoquinas en las poblaciones de monocitos de sangre periférica (SP)

### Macrófagos

Los macrófagos son células con alta capacidad fagocítica, que presentan gran capacidad microbiostática y microbicida, mediada por mecanismo oxígeno-dependiente y oxígeno-independiente. Los macrófagos se originan a partir de monocitos circulantes que al extravasarse se diferencian. Los macrófagos establecen poblaciones estables en los diversos tejidos y asumen fenotipos especializados. Actúan como CPA profesionales al presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T a través de moléculas MHC I y II. En respuesta al reconocimiento de PAMPs o citoquinas producidas por los propios macrófagos o por otras células del sistema inmune, los macrófagos secretan un amplio espectro de citoquinas. Según el microambiente en el cual se ha diferenciado y la naturaleza y tenor de las señales censadas, el macrófago podrá activarse de forma diferente y manifestar un perfil funcional particular. En presencia de IFN- $\gamma$ , producido por las células activadas Th1, las CD8<sup>+</sup> y las NK, los macrófagos aumentan su capacidad de presentar antígenos, aumentan la síntesis de citoquinas proinflamatorias (IL-12 e IL-23) y mediadores tóxicos, y aumentan la fagocitosis mediada por complemento. Los macrófagos adquieren la capacidad de matar bacterias,



especialmente intracelulares. Los macrófagos activados por la vía clásica se denominan macrófagos M1 y cumplirían un papel proinflamatorio. Por el contrario, en los últimos años se han propuesto vías alternativas de activación de los macrófagos llamados M2. Estos macrófagos M2 se activan por la vía alternativa en presencia de IL-4 e IL-13 producidas por células Th2, NKT, basófilos mastocitos y eosinófilos<sup>62-65</sup>. Los macrófagos M2 se cree que actúan frente a patógenos extracelulares, como los helmintos, aumentando la secreción de citoquinas como IL-10 y favorecerían la respuestas de tipo Th2 promoviendo la angiogénesis y la reparación tisular<sup>66</sup> (Figura 5).



**Figura 5. Modelo de activación de macrófagos en el contexto de la respuesta inmune.** Para su activación los macrófagos requieren dos señales: una es el reconocimiento del PAMPs por los PRR y otro es la estimulación con citoquinas presentes en el microambiente. (a) La presencia de IFN- $\gamma$  generada por células de la inmunidad innata o las células Th1 y la señalización a través de PRR induce la activación clásica del macrófago, M1(b). Los eosinófilos, basófilos generan la primera señal al secretar IL-4 e IL-13 y luego de la estimulación por PAMPs, los macrófagos se activan por la vía alternativa favoreciendo la generación de una respuesta Th2.

### **Células Dendríticas**

Las células dendríticas tienen una amplia distribución por todo el organismo y son las principales células presentadoras de antígenos ya que son las únicas capaces de generar una respuesta inmune primaria al procesar y presentar antígenos a la célula T vírgenes. Se encuentran en tejidos linfoides y no linfoides. 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 CDs<sup>67</sup>.

Las CDs 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 quemoquinas 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 CD<sup>+</sup> migran hacia los ganglios linfáticos más próximos en donde se encuentran con los LT vírgenes. 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<sup>+</sup> conduce a su diferenciación en linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, la activación de los LT CD4<sup>+</sup> puede llevar a su diferenciación en al menos cuatro perfiles diferentes: Th1, Th2, Th17, T reguladoras inducibles (iT<sub>reg</sub>)

La decisión sobre el tipo de célula al que se va a diferenciar el LT CD4<sup>+</sup> virgen ocurre luego del reconocimiento antigénico (sobre células que expresen MHC de clase II), durante la expansión clonal y está determinado 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. En los últimos años se ha caracterizado a las poblaciones Th17 y T<sub>regs</sub>. 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 iT<sub>regs</sub>. Este esquema es una sobre 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 T<sup>68</sup>.

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- $\gamma$  e IL-2, y también TNF- $\beta$ . 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-22<sup>69</sup>.

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).

### **Otros componentes celulares de la Respuesta Inmune Innata**

Las células asesinas naturales (NK), constituyen el 15% de los linfocitos sanguíneos, y se originan de precursores linfoides de la médula ósea. Se diferencian de los linfocitos por su mayor tamaño y granularidad y también se pueden distinguir funcionalmente de los LB y LT por su capacidad para lisar células sin sensibilización previa. Los marcadores típicos para las NK son CD56 y CD16. Estas células cumplen un papel destacado en el control de infecciones con patógenos intracelulares, eliminación de células tumorales y determinación del perfil de la respuesta adaptativa frente a patógenos.

Los linfocitos T $\gamma\delta$  son abundantes especialmente en los epitelios de las mucosas y constituyen solo una pequeña proporción de células T circulantes. Estos linfocitos T $\gamma\delta$  son linfocitos intraepiteliales y presentan un repertorio de receptores dirigido fundamentalmente contra determinados antígenos bacterianos o virales.

Los linfocitos B1 son una subpoblación que se diferencia por su localización anatómica, funcionalidad y fenotipo de los linfocitos B convencionales. Los B1 son las células productoras de los anticuerpos IgM naturales, presentes en el suero, y producidos aún en ausencia de cualquier antígeno específico. Estas células B1 son la población B dominante en la cavidad peritoneal y pleural y presentan un fenotipo característico de células activadas con un mayor tamaño celular que las células B convencionales. Los anticuerpos producidos

por las B1 participan en una variedad de procesos fisiológicos como la eliminación de células senescentes o apoptóticas, la regulación inmune y la resistencia a infecciones.

Los eosinófilos constituyen en individuos sanos 2-5% de los leucocitos circulantes. Son capaces de fagocitar y destruir microorganismos pero su principal función es a través de la liberación del contenido de sus gránulos citoplasmáticos. Los eosinófilos son atraídos por determinados productos que liberan las células T y los mastocitos en el foco inflamatorio y luego de la unión de complejos inmunes al receptor Fc degranulan liberando la toxina MBP (proteína básica mayor). Estas células cumplen un rol importante en el combate de infecciones por parásitos y por otro lado están involucrados en patologías como alergia, asma y dermatitis.

Los basófilos constituyen el 0.2% de leucocitos circulantes. Los basófilos sanguíneos maduros presentan gránulos recubiertos por membranas que contienen heparina e histamina entre otros mediadores. Estas células producen además mediadores como LTC<sub>4</sub>, IL-4 e IL-13 que contribuyen a la inflamación en la alergia. Sin embargo, se cree que los basófilos cumplen un papel importante en los procesos inmunitarios contra parásitos.

Por otro lado los mastocitos se dividen en dos categorías según su distribución tisular: mastocitos de tejido conjuntivo y mastocitos de mucosas. El estímulo que desencadena la degranulación suele ser un alérgeno. Para que esto ocurra, el alérgeno debe ser capaz de entrelazar las moléculas de IgE unidas a la superficie del mastocito a través de sus receptores FcεRI. La degranulación de los basófilos y mastocitos es siempre masiva liberándose simultáneamente todos los gránulos de la célula. Algunos de los mediadores que se liberan en el proceso como la histamina son los causantes de los síntomas nocivos de la alergia.

### 3. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

#### 3.1. Componentes celulares

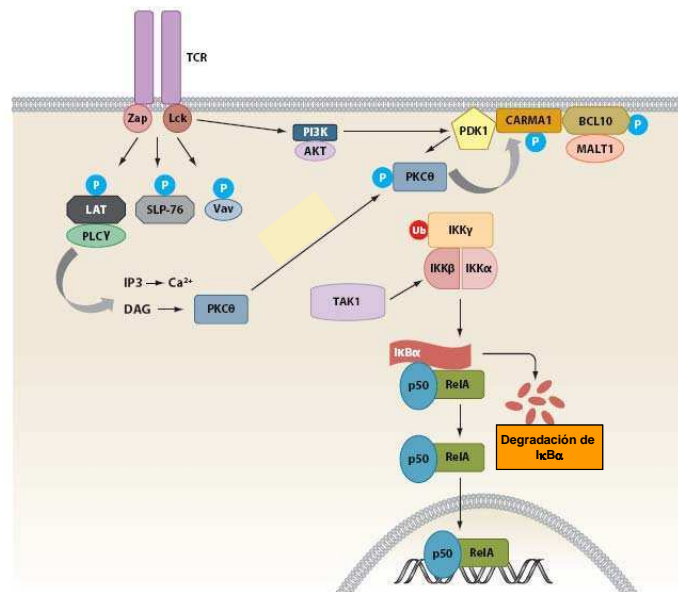
Los linfocitos B constituyen el 5-15% del conjunto de linfocitos circulantes. Se caracterizan por la presencia de inmunoglobulinas en su superficie que actúan como receptores específicos de antígenos. La mayoría de las células B humanas de sangre periférica expresan dos isotipos de inmunoglobulinas sobre su superficie, IgM e IgD. La inmunoglobulina se encuentra asociada a otras moléculas de la superficie de la célula B formando el complejo receptor B (BCR). Estas moléculas accesorias son heterodímeros  $Ig\alpha$  (CD79a) e  $Ig\beta$  (CD79b) y participan en el fenómeno de activación celular. Las células B se activan cuando se unen a sus antígenos específicos libres, pero necesitan la colaboración de las células T para ser activadas. Luego de la activación muchos blastos de células B maduran y dan lugar a células productoras de anticuerpos, que evolucionan *in vivo* y se convierten en células plasmáticas totalmente diferenciadas. La vida media de los plasmocitos es corta, se destruyen por apoptosis luego de unos cuantos días.

Los linfocitos  $T\alpha\beta$  se pueden subdividir en dos poblaciones diferentes: una subpoblación posee el marcador CD4 es la célula T colaboradora (Th), mientras que la otra subpoblación posee el marcador CD8 y ejerce una función citotóxica (CTL). Como se detallará más adelante, las células Th también se pueden clasificar de acuerdo con las citoquinas que secretan: Th1, Th2, Th17 y Treg.

La respuesta de los CTL es necesaria para el control de infecciones bacterianas y virales. Los CTL llegan al foco inflamatorio y destruye específicamente las células infectadas o células tumorales. La respuesta de las CTL tiene varias fases: la fase inductora los CTL vírgenes son activados por CPA y sufren una gran expansión y adquieren el fenotipo efector. En la fase efectora los CTL maduros viajan desde los ganglios donde se activaron al foco inflamatorio y producen la eliminación del patógeno al matar a las células infectadas o eliminan las células tumorales. Luego comienza la fase de contracción en la cual mueren 90-95% de las células expandidas, el resto se mantiene como células de memoria. En la fase de mantenimiento de la memoria se conserva un número constante de células de memoria por muchos años en el hombre y frente a una reexposición al patógeno estas células generan una mejor respuesta inmune más rápida y efectiva<sup>70</sup>.

### 3.2. Activación T

El reconocimiento en el ganglio linfático de un complejo antígeno-MHC por parte del TCR y la unión de moléculas coestimuladoras desencadenan un sistema de transducción de señales dentro de la célula T. Uno de los primeros acontecimientos es la fosforilación de los motivos ITAM (immunoreceptor tyrosine-phosphorylated activation motif) localizada en la cola citoplasmática de la cadena  $\zeta$  del CD3 por parte de la tirosin kinasa (TK) de la familia src (Lck and Fyn). La tirosin kinasa ZAP-70 también se une a ITAM y se activa, activando a su vez a la fosfolipasa C que desencadena una vía clásica de transmisión de señales en la célula que involucra la generación de IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup> y DAG<sup>71</sup>. Finalmente se forma un complejo que ubiquitina a IKK $\gamma$ , produce la activación de IKK $\beta$  y este complejo fosforila al inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  produciendo su degradación y con ello la activación de NF- $\kappa$ B. Además estas señales activan a otros factores de transcripción latentes en el citoplasma como NFAT (“Nuclear factor of activated T cells”) y que junto con NF- $\kappa$ B migran al núcleo y activan genes proinflamatorios como IL-2 e IL-2R. La activación de los LT deriva indefectiblemente en la producción de IL-2, cuyo efecto sería gatillar la proliferación y diferenciación linfocitaria (Figura 6).



**Figura 6. Activación T a través del TCR.** El NF- $\kappa$ B se encuentra normalmente en el citoplasma asociado con proteínas inhibitoras denominadas I- $\kappa$ B $\alpha$ . La fosforilación de I- $\kappa$ B $\alpha$  por quinasas específicas, activadas por las vías de señalización, provoca la degradación de I- $\kappa$ B $\alpha$  por la vía del proteosoma y permite a NF- $\kappa$ B migrar hacia el núcleo para ejercer el efecto genómico.

### 3.3. Rol de la IL-2 en la activación linfocitaria

La activación de las células T a través del TCR y moléculas coestimuladoras como CD28 causa la producción de IL-2 y la expresión del receptor para IL-2 (IL-2R). La interacción IL-2/IL-2R genera una gran expansión clonal y el desarrollo de células efectoras. Este modelo coloca a la IL-2 en el centro de la respuesta inmune dependiente de células T. Sin embargo, fue muy sorprendente encontrar que los animales “knock out” para IL-2 o IL-2R no eran inmunodeficientes sino que presentaban desordenes linfoproliferativos y autoinmunes<sup>72-74</sup>. Hoy se cree que la causa de esta autoinmunidad asociada a la falla en el sistema IL-2/IL-2R se deben a un defecto en la generación de células Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>). Esta población de células suprime los clones T potencialmente autoreactivos en periferia que escaparon de la selección tímica. Además se demostró que animales deficientes en IL-2 podían montar una respuesta protectora frente a una variedad de agentes infecciosos<sup>75,76</sup>. Por lo tanto, quedó determinado que a pesar que la IL-2 es esencial para las respuestas T *in vitro*, no es indispensable para la inducción de una inmunidad T eficiente *in vivo*. Sin embargo, hoy se cree que la IL-2 es necesaria para mantener la respuesta T de memoria<sup>77,78</sup>.

La IL-2 es una citoquina de 15 kDa producida predominantemente por linfocitos CD4<sup>+</sup> activados y en menor medida por CD8<sup>+</sup> activados. Las CD4<sup>+</sup> activadas, células NK y NKT también pueden producir IL-2 pero su relevancia biológica todavía no es clara. La IL-2 es rápidamente y transientemente producida luego de la estimulación del TCR y moléculas coestimuladoras en linfocitos T vírgenes. Como se explicó en la sección anterior la señal generada por el TCR induce AP-1, aumenta los niveles de NF-kBp65/rel activado, y causa la defosforilación de NFAT promoviendo su translocación al núcleo. Este factor de transcripción junto con OCT-1 se une a sitios específicos 300 pb río arriba del promotor mínimo y contribuyen a la transcripción del gen de IL-2. El mecanismo que determina el silenciamiento del gen IL-2 luego de la activación T es menos conocido pero involucra a moléculas como Zfx1a y CREM<sup>79-81</sup>. Recientemente, se ha descrito que T-bet reprime la expresión de IL-2 al interactuar con Rel-A en regiones próximas al promotor de IL-2<sup>82</sup>.

Por otro lado el receptor de IL-2 está constituido por 3 subunidades, IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122) y  $\gamma$ c (CD132). Estas 3 subunidades se requieren para formar el receptor de alta afinidad para IL-2R (Kd~ 10<sup>-11</sup>M). El receptor para IL-2, no existe como heterodímero



preformado, sino que CD25 inicialmente se une con IL-2 y este evento promueve la asociación con CD122 y CD132. Esta estructura cuaternaria induce una señal intracelular que depende de los dominios citoplasmáticos de CD122 y CD132. Cuando se encuentran próximas, Jak-3 y Jak-1 fosforilan residuos de tirosina en la molécula CD122, lo que permite la asociación del adaptador Shc y luego de Stat5 o Stat3. Por otro lado, Shc provee una plataforma para activar las vías de MAPK y PI3K involucradas en el crecimiento celular y supervivencia<sup>83</sup>. Los Stats asociados son entonces fosforilados, forman dímeros y translocan al núcleo, donde Stat5 es el principal inductor de la expresión de genes importantes en la función efectora. Para llevar a la célula T a la fase S de la mitosis se requiere una señalización a través del IL-2R sostenida por varias horas<sup>84</sup>. Por lo tanto, la expansión clonal de células T requiere de alguna forma una fuente prolongada y continua de IL-2. Con respecto a la inducción de la producción de IL-2 por antígenos específicos en linfocitos CD4<sup>+</sup> vírgenes *in vivo*, estudios indican que las células comienzan a producir IL-2 una hora después del estímulo y que a las 5-6 hs. el 80% de las células T específicas para el antígeno producen su máximo nivel de expresión<sup>85</sup>. Luego de las primeras 6 horas, la secreción disminuye y es indetectable a las 16 hs. En tanto que el mRNA y las proteínas alcanzan un pico 6-12 hs después del desafío con el antígeno. Por lo tanto, la producción de IL-2 *in vivo* es más rápida y transiente que la observada *in vitro*<sup>86,87</sup>.

Por otro lado, CD25 se expresan en forma constitutiva en células T regulatorias naturales CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Como en las células efectoras, la expresión de CD25 en Treg es influenciada por la activación del TCR y el aumento de IL-2. Otra molécula que regula los niveles de CD25 en las células Treg es TGF- $\beta$ 1<sup>88</sup>.

### **3.4. Mecanismos efectores de la respuesta inmune adaptativa**

Entre los mecanismos efectores más importantes de la respuesta inmune adaptativa se encuentra la generación de anticuerpos por parte de los linfocitos B. Los anticuerpos presentan especificidad hacia los antígenos microbianos y pueden inhibir el proceso infeccioso bloqueando directamente la penetración del patógeno en el organismo. Estos anticuerpos se denominan anticuerpos neutralizantes. Un mecanismo similar suele ser eficiente en la inmunidad contra toxinas, en este caso los anticuerpos bloquean el sitio

activo de la toxina. Sin embargo, muchos anticuerpos generados en la respuesta inmune no son neutralizantes pero sirven para opsonizar al microorganismo y generar otros mecanismos efectores como son: la activación del complemento por la vía clásica o la activación de la respuesta celular mediada a través de los receptores Fc presentes en los leucocitos.

Otro de los mecanismos efectores de la respuesta inmune adaptativa es la generación de un pool de linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos TCD8<sup>+</sup> efectores abandonan los órganos linfáticos secundarios donde se activaron y se dirigen a los tejidos inflamados, en busca de células que presentan el mismo antígeno en el contexto de MHCI que dio lugar a su activación. Las CTL pueden destruir a las células blanco por dos mecanismos que llevan a la apoptosis: mediante la liberación de granzimas y perforinas y a través del sistema FaL/Fas.

Por otro lado, al activarse en los ganglios linfáticos los linfocitos TCD4<sup>+</sup> no sólo se expanden sino que también se diferencian a células efectoras capaces de mediar diferentes acciones mediante la secreción de distintos patrones de citoquinas. La activación de los LT CD4<sup>+</sup> puede llevar a su diferenciación en cuatro perfiles diferentes: las Th1 generan una respuesta inmune celular al activar macrófagos mediante la secreción de IFN- $\gamma$ , GM-CSF y TNF- $\alpha$ ; las Th2 que promueven la producción de anticuerpos por parte de los LB al secretar IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13; las Th17 que producen una respuesta inflamatoria aguda al reclutar a los PMN a través de la secreción de IL-17 e IL-17F y las iT<sub>reg</sub> (células Treg inducidas) cumplen un papel en el control de la inflamación al secretar citoquinas como IL-10 y TGF- $\beta$ . Cabe aclarar que antiguamente se pensaba que las T colaboradoras que actuaban en la colaboración T-B para la producción de anticuerpos, eran las Th2. Actualmente se sabe que los linfocitos T que colaboran con los linfocitos B, son las Thf (linfocitos T colaboradores foliculares) y que las Th2 son las encargadas de la respuesta inmunes frente a helmintos, parásitos y alérgenos.

Como ya se menciona la decisión sobre el tipo de célula al que se va a diferenciar el LT CD4<sup>+</sup> virgen ocurre luego del reconocimiento antigénico (sobre células que expresen MHC de clase II) y durante la expansión clonal. Es decir, no existe predeterminación genética que favorezca uno u otro linaje. Por el contrario la diferenciación esta determinada por las características del microambiente presente en el medio al momento de la activación. Se

sabe que el fenotipo efector será determinado por diversas señales en distintos niveles de regulación, a saber:

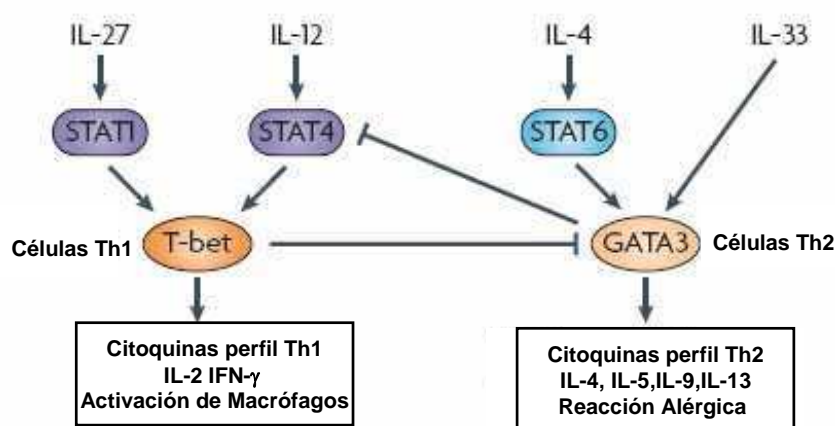
- i) el tiempo de desarrollo de la respuesta inmune: se conoce que la respuesta Th1 aparece más temprano que la respuesta Th2.
- ii) el tipo celular que participa en la presentación antigénica: las células dendríticas o macrófagos favorecen la diferenciación Th1, mientras que la mediada por linfocitos B estimula el desarrollo Th2.
- iii) las citoquinas presentes en el microambiente: la IL-12 estimula los clones Th1, mientras que la IL-4 hace lo propio con los clones Th2. El TGF- $\beta$  estimula la generación de células Treg inducibles. La IL-6 y el TGF- $\beta$  estimulan la diferenciación de linfocitos Th17.

Los trabajos pioneros de Mossman<sup>89</sup> demostraron la existencia de subgrupos de linfocitos TCD4<sup>+</sup> a los que denominaron Th1 y Th2, que podían diferenciarse según un patrón específico de secreción de citoquinas. Las citoquinas centrales de los clones Th1 son la IL-2 e IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$  que se asocian a reacciones inflamatorias mediadas por células. Varias citoquinas del perfil Th1 activan reacciones citotóxicas, inflamatorias y de hipersensibilidad retardada. A su vez, los clones Th2 producen cantidades abundantes de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Las citoquinas de perfil Th2 son consideradas como anti-inflamatorias y se asocian con la regulación de las respuestas alérgicas y de anticuerpos de gran magnitud.

Szabo y colaboradores describieron la presencia de un factor de transcripción crucial para el desarrollo Th1 al cual denominaron T-bet<sup>90</sup>. Este factor de transcripción pertenece a la familia T-box y presenta una alta homología con otros miembros de esa familia a nivel del dominio central de unión a DNA. El factor T-bet es el primer factor de transcripción involucrado en el control transcripcional de IFN- $\gamma$  y tiene efectos sorprendentes en la diferenciación Th1. La transfección de T-bet en distintas líneas celulares induce la activación de IFN- $\gamma$  y la incorporación de T-bet a células Th2 permitió redireccionar el linaje celular hacia un fenotipo Th1, lo que sugiere la reversibilidad del pasaje Th1/Th2.

Por otro lado, se describió otro factor de transcripción GATA-3 que cumple funciones en la maduración tímica temprana. Además, este factor de transcripción se induce en forma diferencial en células Th2 y es reprimido en células Th1 y esto concuerda con la presencia

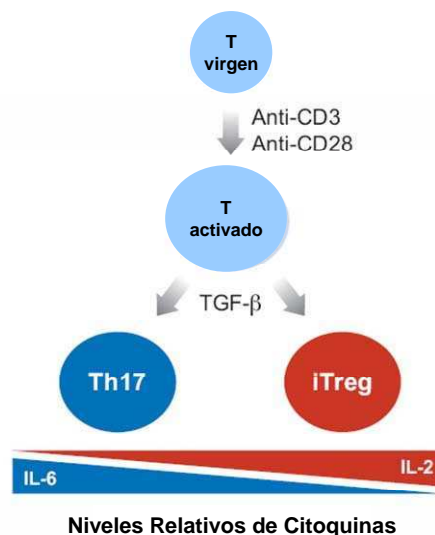
de GATA en el promotor de IL-4 e IL-5. Se ha demostrado que clones Th2 tranfectados con la secuencia antisentido de GATA-3, disminuyen la expresión de citoquinas Th2. Por el contrario, clones Th1 tranfectados con GATA-3 inducen la expresión de IL-5. Existe un mecanismo de contraregulación que controla el balance entre estos perfiles ya que la IL-4 producida por los Th2 inhibe las citoquinas y la proliferación de clones Th1, mientras que el IFN- $\gamma$  producido por las células Th1 bloquea la síntesis de citoquinas Th2 y la proliferación de esta subpoblación (Figura 7).



**Figura 7. Diferenciación Th1/Th2.** Las células Th1 expresan el factor de transcripción T-bet y secretan IL-2 e IFN- $\gamma$ , activan a los macrófagos y eliminan a los patógenos intracelulares. En contraste las células Th2 expresan el factor de transcripción GATA-3 y producen citoquinas como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 que permiten la diferenciación de LB a plasmocitos productores de anticuerpos.

La función principal de las células Th17 parece ser la eliminación de patógenos que no son correctamente combatidos por las células Th1 y Th2. Sin embargo, las células Th17 son potentes inductores de la inflamación en los tejidos y han sido asociadas con la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes experimentales. Las células Th17 secretan no solo IL-17 sino que producen IL-17F, IL-21 e IL-22; citoquinas que colaboran en los procesos inflamatorios. Además las células Th17 no son la única fuente de IL-17. Ha existido gran confusión respecto a los estímulos para la diferenciación hacia células Th17 en humanos. En el año 2007 varios estudios afirmaron que TGF- $\beta$  era indispensable para la diferenciación a células Th17<sup>91, 92</sup>. Mientras que otros trabajos mostraban que las células

CD4<sup>+</sup> vírgenes se diferenciaban a Th17 luego de ser expuestas a TGF- $\beta$  más IL-6 o TGF- $\beta$  más IL-2 o una combinación de IL-1 $\beta$  más IL-6 o IL-1 $\beta$  más IL-23. Estos resultados plantearon un problema en cuanto al papel del TGF- $\beta$  en la diferenciación de células Th17. Hoy se sabe que en estos protocolos experimentales no se controló rigurosamente la fuente de TGF- $\beta$  ya que la purificación de células CD4<sup>+</sup> vírgenes se encontraba contaminada con plaquetas, una de las mayores fuentes de TGF- $\beta$ . En los últimos años, tres trabajos independientes demostraron que el TGF- $\beta$  es fundamental para generar células Th17 a partir de células CD4<sup>+</sup> vírgenes<sup>93,94,95</sup>. Estos trabajos demostraron que TGF- $\beta$  es absolutamente necesario para inducir la expresión de RORc, el factor de transcripción característico del perfil Th17, pero un exceso de TGF- $\beta$  causa su inhibición. Sólo cuando hay citoquinas como IL-6 mas IL-23 o IL-21, RORc se libera de la inhibición y las células comienzan la expresión de IL-17<sup>94</sup>. Es por eso que existe una relación recíproca mutuamente excluyente entre las células Th17 y las Treg *in vitro*. Sin embargo todavía no existe evidencia que demuestre que este comportamiento también se observa *in vivo*. En la siguiente sección se describirá en más detalles las células Treg.



**Figura 8. Balance Th17/Treg.** La producción de IL-17 por células T se genera luego de la estimulación del TCR y CD28 en presencia de TGF- $\beta$  e IL-6. La generación de células Th17 es inhibida por la IL-2 a través de Stat5<sup>96</sup>. Además la inducción de Foxp3 por parte de TGF- $\beta$  es totalmente dependiente de la presencia de IL-2.

#### **4. CONTROL DE LA RESPUESTA INMUNE**

Es bien conocido que el sistema inmune desempeña un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis de los diferentes tejidos. Sus mecanismos efectores, son efectivos para resolver procesos infecciosos, pero a su vez, pueden causar daño al huésped. Es por ello, que la misma respuesta inmune conduce al desarrollo de mecanismos efectores y, a su vez, a mecanismos que controlan los mismos. Es posible reconocer mecanismos homeostáticos de control en la respuesta inmune adaptativa y en la respuesta inmune innata. Fallas en estos mecanismos homeostáticos tendrán como consecuencia el desarrollo de patologías autoinmunes.

##### **4.1. Homeostasis de la respuesta adaptativa**

La capacidad inmunoreguladora del sistema inmune no tiene sólo como blanco de acción a los clones autoreactivos, sino que también a los clones T y B que se han activado y expandido a partir del reconocimiento del antígeno. Entre los mecanismos de mayor relevancia que controlan la expansión clonal T y la regulación del número de células T efectoras en periferia se encuentran:

- i) Muerte por negligencia: en ausencia del antígeno se observa una rápida declinación del número de linfocitos T efectoras, que mueren por apoptosis.
- ii) Inhibición mediada por CTLA-4: CTLA-4 inhibe la expansión clonal T al inducir señales inhibitorias en las células T y al desplazar a CD28 de las moléculas coestimuladoras.
- iii) Muerte inducida por Fas/FasL: las células T expresan constitutivamente la molécula Fas y su activación genera la expresión de FasL. La interacción Fas/FasL desencadena la apoptosis de los linfocitos.
- iv) Células T reguladoras: las Treg inhiben la activación y expansión de células efectoras mediante la producción de IL-10 y TGF- $\beta$  y por la inhibición mediada por CTLA-4.

En las células Treg el factor de transcripción Foxp3 es esencial y es hasta ahora el mejor marcador para estas células. En humanos, Foxp3 se expresa en células Treg pero algunas células T efectoras activadas expresan de forma transitoria, bajos niveles de Foxp3<sup>97</sup>. Se ha observado, en varias enfermedades humanas, la presencia de Treg no funcionales por

mutaciones en el receptor para IL-2<sup>98-100</sup>. Estos pacientes presentan anomalías como autoinmunidad, linfadenopatías y persistencia de infecciones virales.

Las células Treg son una de población de células con una alta tasa de proliferación *in vivo*<sup>101</sup>; pero estas células se caracterizan por presentar una baja respuesta o anergia frente a la estimulación vía TCR e IL-2 *in vitro*. No obstante, las Treg puestas en cultivo pueden inhibir la proliferación de células T inducidas por el TCR inhibiendo la producción de IL-2<sup>102, 103</sup>. La IL-2 que inicialmente es producida por los linfocitos T activados actúa sobre las Treg favoreciendo su supervivencia, crecimiento y su actividad supresora que en definitiva causa la inhibición de la producción de IL-2 y la proliferación de las células T convencionales<sup>104-106</sup>.

Además de las células Treg naturales existe evidencia que en periferia se generan células Treg inducidas (iTreg) que son Foxp3<sup>107</sup>. Células T vírgenes pueden transformarse en iTreg *in vitro* luego de su activación vía TCR cuando son cultivadas con TGF- $\beta$  e IL-2<sup>108,109, 110</sup>. Estas células presentan capacidad supresora *in vitro* y pueden llegar a ser una herramienta de transferencia adoptiva en inmunoterapia.

#### **4.2. Homeostasis de la respuesta innata**

El control de los mecanismos efectores de la inmunidad innata es una etapa necesaria para mantener la homeostasis en los tejidos luego de la activación de la respuesta inflamatoria. Si se considera al sistema complemento, su activación y la actividad de los componentes generados durante su transcurso están estrictamente regulados por un conjunto de proteínas solubles y receptores que actúan mediante diferentes estrategias. Por ejemplo, el factor H se une a C3b e inhibe la activación de la C3 convertasa de la vía alterna y además ayuda al factor I para clivar e inactivar a C4b y C3b regulando de esta forma la activación de la vía alterna. Otras proteínas solubles como C1 INH y C4BP inhiben la vía clásica al bloquear a C1s y C4b respectivamente. En cuanto a los inhibidores del complemento asociados a membrana CR1 (CD35) se une a C3b y C4b e inhibe la formación de las convertasas de C3 de ambas vías.

La resolución de la inflamación tiene como punto central la remoción de los neutrófilos y leucocitos apoptóticos. Los encargados eliminar a las células muertas son los macrófagos que reconocen sobre la superficie de células apoptóticas moléculas como fosfatidilserina,

fosfolípidos oxidados, GAS6, MFGE8, ICAM-3. La unión de estas moléculas con receptores específicos en los macrófagos como los receptores de la familia TAM (Tyro3, Mer),  $\alpha_v\beta_3$ -integrina, TIM4 y CD36<sup>111,112</sup> facilitan la fagocitosis. Luego de la fagocitosis de la célula apoptótica, el macrófago adquiere un fenotipo tolerogénico ya que suprime la producción de citoquinas inflamatorias y secreta citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$  que contribuyen a la resolución de la inflamación<sup>113, 114</sup>.

Por otro lado, para mantener la homeostasis en los tejidos es necesario proteger y evitar el daño causado por la degranulación de los leucocitos en el foco inflamatorio. La actividad extracelular de las proteasas liberadas por los PMN es inhibida por las serpinas que son los inhibidores endógenos de las serino proteasas. De esta forma la elastasa, la catepsina G y la proteinasa3 son inhibidas por  $\alpha_1$ -antitripsina, elafin y SLPI<sup>40</sup>. Como ya se menciono, las serpinas presentan un sitio ideal como sustrato para la proteasa, esto atrapa a la enzima y modifica su sitio catalítico inactivándola<sup>41</sup>. El rol del SLPI en la respuesta inmune será descrito en profundidad en la siguiente sección.

## 5. EL SLPI COMO FACTOR DE LA RESPUESTA INMUNE

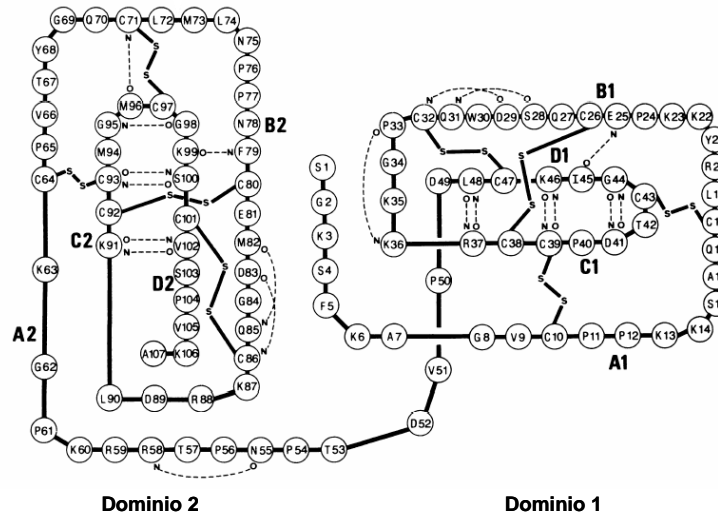
### 5.1. Características generales

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<sup>115,116</sup>. 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 neutrofílicas como la elastasa y la catepsina G<sup>117</sup>.

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 molécula<sup>118</sup> (Figura 9). 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 intrones<sup>119</sup>.



**Figura 9. 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<sup>118</sup>).

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 es producido 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 macrófagos<sup>120-128</sup>. La expresión del SLPI se encuentra significativamente aumentada por la progesterona<sup>129</sup> y por las citoquinas proinflamatorias, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ <sup>130</sup>.

La concentración fisiológica del SLPI en saliva es de 0,35 – 2  $\mu$ M, mientras que en los pulmones su concentración es más elevada en las vías aéreas superiores que en los compartimentos alveolares. La concentración de SLPI, en individuos normales, no fumadores es de aproximadamente 8,7  $\mu$ M en las vías aéreas superiores y de 0,6  $\mu$ M en el

tracto respiratorio inferior<sup>131</sup>. Sin embargo, pacientes con enfisema pulmonar mostraron niveles significativamente inferiores de SLPI que los observados en los pacientes sanos<sup>132</sup>. Se ha descrito al SLPI como una molécula con capacidad para promover la cicatrización de heridas<sup>133</sup>. En modelos murinos, 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- $\beta$  considerada como la tercera función del SLPI<sup>134</sup>. 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 pulmonares<sup>135</sup>. 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- $\beta$ , respectivamente<sup>136</sup>.

## 5.2. Rol del SLPI en la respuesta inmune innata

SLPI inhibe una gran variedad de proteasas incluyendo la elastasa neutrofílica, 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 proteasas<sup>115</sup>. 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 inhibitoria<sup>137</sup>. Ha sido propuesto que el dominio 1 ayudaría a estabilizar el complejo SLPI - elastasa<sup>138</sup>.

La gran afinidad del SLPI por las serino proteasas neutrofílicas y su alta concentración local en el compartimiento bronquial (cerca de 5  $\mu$ M), sugiere que su principal función fisiológica es regular cualquier actividad excesiva de las serino proteasas neutrofílicas en

las vías aéreas superiores. El SLPI sería producido localmente, y colaboraría en la acción anti-elastasa de la  $\alpha$ 1-antitripsina (principal inhibidor sistémico de la elastasa *in vivo*). El SLPI se asocia también 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 neutrofilicas en los sitios de inflamación, como en las superficies de las mucosas,<sup>117</sup>. Por otro lado, 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), que se caracterizan por una excesiva carga de proteasas de origen endógeno o bacteriano y un aumento del stress oxidativo<sup>117</sup>.

El SLPI, es un péptido catiónico no glicosilado que posee propiedades antimicrobianas tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>139</sup>. La actividad antimicrobial ha sido descrita para *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y HIV<sup>139</sup>. En particular, SLPI presenta actividad anti-HIV a través de una interacción con el receptor escramblasa o la proteína anexina II<sup>140,141</sup>. Además, el SLPI murino como el humano poseen actividad antimicrobiana contra micobacteria. En nuestro laboratorio hemos descrito que el SLPI constituye un nuevo receptor de reconocimiento de patrones para micobacteria que no solamente mata la bacteria sino que además facilita su fagocitosis por parte de los macrófagos tanto humanos como murinos<sup>142,143</sup>. La actividad antimicobacteria del SLPI reside en el dominio WAP de la proteína y es muy parecida a otros péptidos catiónicos<sup>144</sup>.

La expresión de SLPI puede ser aumentada en respuesta a estímulos inflamatorios como TNF- $\alpha$  y *M. tuberculosis* e inhibida por adenovirus y TGF- $\beta$ 1<sup>145-150</sup>. Como ya se mencionó más arriba, además de la actividad antimicrobiana, la principal función del SLPI es inhibir la inflamación, bloqueando la actividad proteolítica de las serino proteasas y disminuyendo los niveles de varias citoquinas proinflamatorias<sup>117, 151, 152, 153</sup>. La actividad antiinflamatoria también esta mediada por la inhibición de la degradación proteolítica de I $\kappa$ B y de la

inhibición de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B<sup>154,155</sup>. Además, el SLPI protege la degradación de factores que permiten la resolución de la inflamación. Por ejemplo, PEPI (“epithelial-cell-growth-promotin cytokine”), una molécula secretada por los macrófagos y células epiteliales, promueve la proliferación de células epiteliales y la reparación de heridas. PEPI es degradado por la elastasa, generando epitelinas proinflamatorias. Por lo tanto al inhibir la degradación del PEPI, el SLPI contribuye a mantener la homeostasis del tejido inflamado<sup>133</sup>.

Por otro lado se ha descrito que los macrófagos murinos que fagocitan células apoptóticas producen un aumento en la secreción de SLPI que estaría relacionado en la resolución de la inflamación y la homeostasis<sup>156</sup>. Por último, Samsom et al. propone que la expresión de SLPI en células dendríticas en los ganglios linfáticos cervicales contribuye a generar tolerancia en las mucosas<sup>157</sup> al disminuir la producción de agentes proinflamatorios como IL-12 y MCP-1.

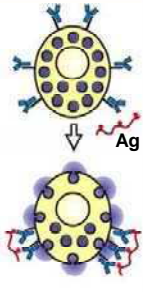
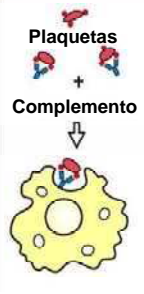
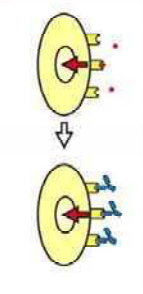
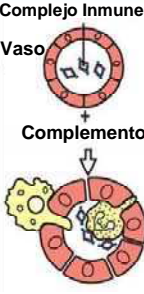
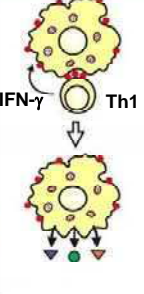
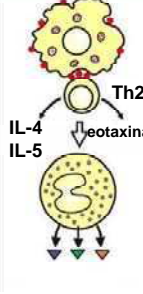
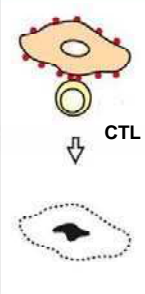
### **5.3. Rol del SLPI en la respuesta inmune adaptativa**

El rol del SLPI en la respuesta inmune adaptativa es menos claro. El SLPI puede modular el cambio de isotipo disminuyendo los cambios hacia IgG e IgA sin afectar la proliferación de las células B<sup>158</sup>. Sin embargo, esplenocitos B de ratones “knock out” para SLPI tienen mayores índices de proliferación y producen altos niveles de IgM<sup>159</sup>. En conjunto estos datos indican que el SLPI puede afectar la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, no se sabe el mecanismo de acción del SLPI sobre la misma, como así tampoco, su participación en el direccionamiento de la respuesta T hacia los diferentes perfiles descritos más arriba. Existen datos que sugieren que el SLPI favorecería la inducción de respuestas de tipo Th1, ya que inhibe la producción de PGE2<sup>160</sup>. Sin embargo, estos datos no concuerdan con el efecto supresor de la inflamación del SLPI observada en un modelo de artritis en ratón<sup>161</sup>. Lo que sí se puede afirmar es que la actividad del SLPI sobre la respuesta inmune adaptativa parece compleja.

### 6. ALTERACION DE LA RESPUESTA INMUNE

La ruptura de los mecanismos homeostáticos descritos más arriba, llevará a la generación de diferentes patologías. Por ejemplo, es posible observar una respuesta inmune exagerada en la hipersensibilidad, la autoinmunidad y, aún, en el rechazo de un órgano trasplantado. Estos tres casos, tienen en común, una respuesta inmune exagerada, y se han utilizado como modelo para evaluar diferentes sustancias con actividad inmunosupresora.

Existen cuatro mecanismos de hipersensibilidad. Las tres primeras son mediadas por anticuerpos, en tanto que la hipersensibilidad IV, es mediada por células. Las características de cada una de ellas se muestran en el cuadro 1.

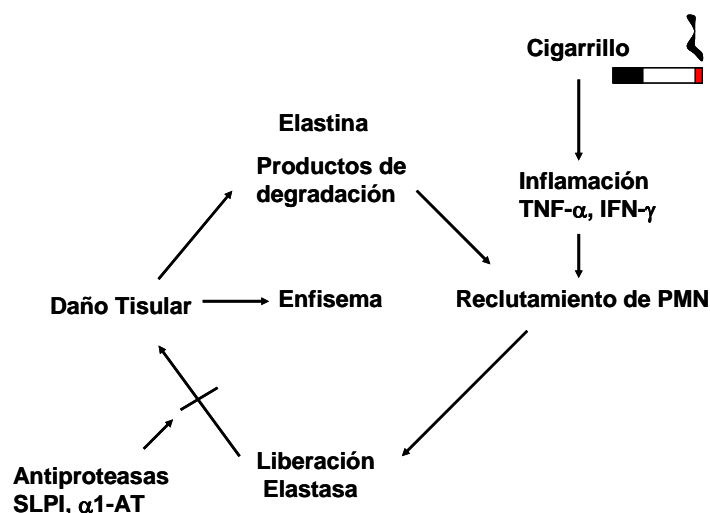
	Tipo I	Tipo II		Tipo III	Tipo IV		
Componente Inmune	IgE	IgG		IgG	Th1	Th2	CTL
Antígeno	Soluble	Célula o asociado a Matriz	Receptor de superficie celular	Soluble	Soluble	Soluble	Asociado a células
Mecanismo Efecto	Activación de Mastocitos	Complemento, FcR, (fagocitos, NK)	Anticuerpos que alteran señales	Complejo Fagocitos	Activación de Macrófagos	IgE, Activación de Eosinófilos Mastocitosis	Citotoxicidad
							
Ejemplo de HSR	Asma, rinitis Alérgica, anafilaxis Sistémica	Drogas Alérgicas (Penicilina)	Urticaria Crónica (anticuerpos contra FcεR1α)	Enfermedad del suero, Reacción de Arthus	Dermatitis por Contacto, reacción de Tuberculina	Asma Crónica, Rinitis alérgica Crónica	Rechazo de injerto

**Cuadro 1. Las respuestas de HSR son mediadas por mecanismos inmunológicos que causan daño tisular.** Se reconocen cuatro tipos de HSR. Las de tipo I a III están mediadas por anticuerpos mientras que la tipo IV esta mediada por la respuesta celular.

En el caso de las enfermedades autoinmunes, existe una ruptura de los mecanismos de tolerancia central o periférica. Los linfocitos autoreactivos que escapan a los procesos de tolerancia central en el timo, y que alcanzan los tejidos periféricos a través del torrente sanguíneo pueden sufrir procesos de autorreconocimiento y tolerancia a nivel periférico, previniendo de esta manera un eventual ataque a tejidos y órganos. Entre los mecanismos más importantes de la tolerancia periférica cabe mencionar: la ignorancia inmunológica, la anergia clonal, la desviación inmune, la apoptosis inducida por activación o propicidio y la generación de Treg. Sin embargo, la ruptura de la tolerancia central y/o periférica llevará a la manifestación de una enfermedad autoinmune. Actualmente, hay un número muy importante de enfermedades autoinmunes. De hecho, muchas enfermedades que en principio no habían sido reconocidas como enfermedades autoinmunes, hoy se las considera como tales. Un ejemplo de ello, es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

La EPOC se puede manifestar como asma, bronquitis crónica o enfisema. La bronquitis se define como la producción diaria de esputo y presencia de tos en por al menos 3 meses durante 2 años consecutivos sin ninguna causa que evidente. El enfisema se define por el aumento anormal del espacio aéreo distal a los bronquiolos terminales y por la destrucción de las paredes alveolares. En el mundo occidental la EPOC está asociada al consumo de cigarrillos. Sin embargo, solo el 15% de los fumadores desarrollan EPOC mientras que el resto de los fumadores son resistentes. Numerosas teorías se pronunciaron para explicar el enfisema producido en los pacientes con EPOC. Desde la década del 60, la hipótesis del desbalance entre las proteasas-antiproteasas ha sido el paradigma dominante en esta área. Esta teoría propone que el pulmón normalmente se encuentra protegido por un “escudo” de antiproteasas que se expresan constitutivamente frente al posible aumento de producción de proteasas. Propone, además, que el enfisema ocurre cuando se produce un aumento excesivo de las proteasas o una disminución en la producción de antiproteasas. El exceso de la actividad proteolítica durante un lapso de tiempo prolongado, genera la ruptura en la matriz extracelular y daño de las paredes alveolares. Existe un consenso generalizado que describe a la inflamación como una causa mayor del desbalance proteasa/antiproteasa en EPOC. Se cree que los neutrófilos, uno de las principales células encargadas de la destrucción de microorganismos, pueden generar la destrucción de células propias y daño

en el tejido al aumentar la secreción de proteasas en el pulmón. En los últimos años nuevas investigaciones han puesto la mirada sobre el rol que desempeñan la inflamación en la patogénesis del enfisema. En particular se describió en pacientes con EPOC la presencia de células que producen grandes cantidades de IFN- $\gamma$  y en un modelo animal de sobre-expresión localizada en el pulmón de IFN- $\gamma$  se observó un aumento en la destrucción alveolar y la presencia de enfisema<sup>162</sup>.



**Figura 10. Patofisiología del enfisema.** El SLPI y la  $\alpha$ 1-AT son los inhibidores de proteasas que controlan la actividad proteolítica de la serino proteasas, en particular, la elastasa neutrofílica. Cuando los niveles de elastasa se elevan, por ejemplo, por un aumento del reclutamiento de fagocito inducido por el humo del cigarrillo, el SLPI y  $\alpha$ 1-AT no logran neutralizar el exceso de proteasa y producen un daño tisular. Los productos de degradación contribuyen a aumentar el reclutamiento de neutrófilos y perpetúan el daño tisular.

A diferencia de las reacciones de hipersensibilidad y las enfermedades autoinmunes, existen otros mecanismos de daño mucho más potentes que se ponen de manifiesto luego del trasplante de un órgano histoincompatible. El rechazo es causado por la respuesta inmune frente a los antígenos expresados en el injerto. Estos antígenos son proteínas que varían entre los individuos y son reconocidos como moléculas extrañas por el receptor. Las células T del receptor reaccionan contra la molécula MHC que es altamente polimórfica y desencadenan el rechazo. Por lo tanto, la compatibilidad de las moléculas de MHC entre el receptor y el dador disminuye la posibilidad de un rechazo del injerto.

## **7. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de esta tesis de doctorado fue determinar la función del SLPI en la respuesta inmune innata y adaptativa, los mecanismos de acción de dicha proteína y el efecto de su administración en modelos *in vivo*. En particular se analizó:

1. La acción del SLPI sobre la activación y proliferación linfocitaria.
2. El efecto de SLPI sobre monocitos y células dendríticas.
3. La capacidad del SLPI de modificar el patrón de expresión de citoquinas.
4. El potencial efecto inmunomodulador del SLPI en modelos de enfermedad autoinmune, hipersensibilidad retardada y rechazo de trasplante.
5. Evaluar los niveles plasmáticos de SLPI en patologías pulmonares y su correlación con la proliferación celular.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. OBTENCION DE SLPI RECOMBINANTE HUMANO

#### 1.1. Expresión de SLPI

A partir de bacterias *E. coli* BL21-Codon Plus-RIL (Stratagene) almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , productoras de SLPI, generadas en nuestro laboratorio, se obtiene un precultivo inoculando 7.5 ml de medio LB (Luria Broth) estéril con Ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y Cloranfenicol (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). El cultivo se incuba durante toda una noche con agitación constante a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente 500 ml de medio LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y cloranfenicol (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) se inoculan con 5 ml del precultivo anterior. Este cultivo se deja crecer a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 medida a 600 nm. Alcanzado este valor, se induce la expresión de SLPI mediante el agregado IPTG (isopropiltiogalactósido) a una concentración final de 1 mM. La inducción se mantiene durante 3 horas a una temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  con agitación constante. Luego el cultivo se centrifuga a 7.000 rpm durante 7 minutos y el pellet se fracciona y se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior purificación.

#### 1.2. Purificación de SLPI

Los pellets se resuspenden en 2 ml de buffer de lisis ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 1M, Imidazol 10 mM; pH 8) y se agrega lisozima hasta llegar a una concentración final de 1 mg/ml. También se incorpora DNAsa y RNAsa a una concentración final de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se deja actuar a estas enzimas durante 30 minutos. Finalmente las bacterias son lisadas por ultrasonido con 7 pulsos de 60 Watts de 30 segundos de duración en un sonicador. Todo el procedimiento se realiza en hielo para evitar la proteólisis. Luego el lisado se centrifuga a 10.000 g durante 30 minutos a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . La fracción soluble se recupera y se adiciona a 800  $\mu\text{l}$  de resina de Niquel- ácido nitrilotriacético (Ni-NTA), previamente equilibrada en buffer de lisis y se incuba durante 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$ . Durante este tiempo se produce la unión de la cola de 6 histidinas del SLPI al  $\text{Ni}^{+2}$  complejo de la resina. Posteriormente se realizan dos lavados de 15 ml con una solución  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 1M, Imidazol 20 mM; pH 8 (“buffer lavado 20”) luego otros dos lavados con 15 ml de una solución  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 1M, Imidazol 40 mM; pH 8 (“buffer lavado 40”) y por

último dos lavados de 5 ml con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 75 mM; pH 8 (“buffer lavado 75”). Finalmente, el SLPI es eluido de la resina por el agregado de 2 ml de una solución NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM; pH 8 (“elusión 250”). La elusión se repite tres veces para obtener el mayor rendimiento posible.

### 1.3. Pureza del SLPI

Se realiza una electroforesis en gel de acrilamida (15%) en condiciones desnaturalizantes para las muestras obtenidas en la purificación del SLPI. Cada una de las muestras correspondientes a los diferentes pasos de la expresión y purificación se tratan con buffer de siembra (0.5% SDS, 1.5% glicerol) y β-mercaptoetanol. Las proteínas se desnaturalizan por calor (95°C, 5 minutos). La corrida se realiza a 100 V durante 20 minutos aproximadamente y luego el gel es teñido con Coomassie-blue durante 30 minutos. Las bandas se observan realizando sucesivos lavados con una solución al 7 % de ácido acético. Finalmente se digitaliza una foto del gel para su posterior análisis. El SLPI así obtenido se encuentra en una solución 250 mM de Imidazol. Cuando se realizaron los primeros ensayos biológicos utilizando el SLPI diluido en buffer imidazol, se observó un efecto per se del buffer (datos no mostrados). Por lo tanto, para evitar este efecto y con el objeto de disminuir la concentración de imidazol, las muestras se dializan en un buffer fosfato conteniendo 2,5 mM de imidazol (ver más abajo).

### 1.4. Diálisis del SLPI y elusión por PolimixinaB

Se utiliza una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 10 kDa a la que se le realizan sucesivos lavados. En la bolsa de diálisis se introducen 2-6 ml de SLPI en buffer de “elusión 250” y se deja dializando toda la noche a 4°C en una solución 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 7,6 y con una concentración de Imidazol que varía según el volumen de SLPI a dializar para obtener al final de la diálisis SLPI en buffer 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl y 2,5 mM Imidazol a un pH de 7,6. Toda la diálisis se realiza con material previamente esterilizado. Luego la muestra con SLPI se eluye por columna de polimixina B - Agarosa (*Sigma*, St. Louis, MO, USA) para eliminar restos de LPS. Los niveles de LPS fueron evaluados usando el test de Limulus (*Pyrotell – Associates of Cape Cod*, Falmouth, MA, USA).

### **1.5. Actividad anti-serinoproteasa**

Los ensayos de inhibición de Tripsina se realizan utilizando el sustrato cromogénico N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (Sigma, Ma) que al ser clivado por la tripsina genera un producto de color amarillo, el p-nitroanilida. La proteína recombinante obtenida en la purificación se incuba con diferentes concentraciones de tripsina (0.02 – 0.05 %) 5 minutos a 37°C. Finalmente se agregan 40 ml de una solución que contiene el sustrato cromogénico diluido 1 en 80 en buffer Tris (50 mM) pH 7,4. La absorbancia se mide a 405 nm cada 2 minutos durante 20 minutos.

### **1.6. Generación de SLPI inactivado**

El SLPI se incubó por 2 hs a temperatura ambiente en una solución de 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  a un pH de 8. Luego se realizó un paso de diálisis con una membrana con un tamaño de poro de 10 kDa a la que se le realizan sucesivos lavados. En la bolsa de diálisis se introducen el SLPI oxidado y se deja dializando toda la noche a 4°C en una solución 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, pH 7,6 y con una concentración de Imidazol que varía según el volumen de SLPI a dializar para obtener al final de la diálisis un SLPI en buffer 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl y 2,5 mM Imidazol a un pH de 7,6.

### **1.7. Cuantificación de la concentración de proteína**

Se construye una curva de calibración con diluciones seriadas de BSA (0-250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en buffer “elusión 250” o en buffer de diálisis. En microplacas de 96 pozos (fondo plano) se coloca 50  $\mu\text{l}$  de las diluciones de BSA y las distintas muestras de SLPI. Luego se agregan 50  $\mu\text{l}$  de la solución obtenida con 50 partes del reactivo A, 48 partes de B y 2 partes de C del Kit de MicroBCA (Pierce, USA). La placa se incuba durante una hora a 37° C después de lo cual se lee a 550 nm en el lector de ELISA. Se grafica una curva de concentración en función de la densidad óptica. Finalmente, se obtiene el valor de la concentración de SLPI calculando la pendiente y la ordenada de origen de la curva como  $[\text{SLPI}] = (\text{DO}_{550 \text{ nm}} - \text{DO}_{550 \text{ nm}}^{\text{SLPI-B}}) / \text{pendiente}$ . Como producto final de las distintas purificaciones realizadas se obtuvo SLPI en concentraciones que variaron entre 40 y 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  diluidas en buffer 50 mM

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol y pH de 7,6. El SLPI generado tuvo la capacidad para inhibir la acción de la tripsina en los ensayos de actividad inhibitoria.

## **2. OBTENCIÓN DE CELULAS Y MEDIOS CONDICIONADOS**

### **2.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)**

A partir de sangre periférica anticoagulada con EDTA y ACD se hizo una dilución al medio en solución fisiológica de la misma y se colocó sobre un gradiente de Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, UI, Suecia) (densidad = 1,077 g/cm<sup>3</sup>). Luego las células fueron centrifugas 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 de complementado (Gibco, Grand Island, NY, USA).

### **2.2. Aislamiento 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-Paque<sup>TM</sup> PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, UI, Suecia) (densidad = 1,077 g/cm<sup>3</sup>) 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 linfocitos, sin alterar la densidad de los monocitos, facilitando la posterior separación en un gradiente

de Percoll.<sup>163</sup> 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 deplegado (SBF) (Gibco, Grand Island, NY, USA), L-glutamina (2mM) y gentamicina (40 µg/ml) a 37 °C en estufa con 5 % CO<sub>2</sub>.

En algunos experimentos los monocitos se aislaron a partir de CMSP por selección positiva de células CD14+ con perlas magnéticas. Se resuspendieron  $2 \cdot 10^7$  CMSP en 0.5 ml de solución fisiológica 2% SBF y se incubaron a 4° por 30 minutos con 15 µl de anticuerpo IgG de ratón anti-CD14 (Clon TÜK4 mAb, Dako, Denmark). Luego se realizaron 3 lavados con 1 ml de solución fisiológica y 2% SBF. Las células se resuspendieron y se incubaron (30 minutos a 4°C con agitación suave) con  $4 \cdot 10^7$  perlas magnéticas anti IgG de ratón (DynaMag Magnet, Invitrogen). Luego de la incubación se colocó el eppendorf en el magneto (DynaMag Magnet, Invitrogen) por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células adheridas al magneto se recuperaron y se lavaron con 1 ml de solución fisiológica 2% SBF. Estas células se volvieron a colocar en el magneto por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se volvieron a recuperar las células adheridas al magneto. Finalmente luego de los lavados se contaron las células y se verificó el porcentaje de pureza de los monocitos por citometría de flujo.

### **2.3. 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  $20 \times 10^6$  células en placas de Petri de 100 x 20 mm durante 5-7 días en estufa a 37 ° C y 5 % CO<sub>2</sub>. La pureza de éstas CDs fue confirmada mediante inmunomarcaciones específicas para CDs.

#### **2.4. Selección negativa de linfocitos**

Se resuspendieron  $2 \cdot 10^7$  CMSP en 0.5 ml de solución fisiológica 2% SBF y se incubaron a 4° por 30 minutos con 15 µl de anticuerpo IgG de ratón anti-CD14 (Clon TÜK4 mAb, Dako, Denmark). Luego se realizaron 3 lavados con 1 ml de solución fisiológica y 2% SBF. Las células se resuspendieron y se incubaron (30 minutos a 4°C con agitación suave) con  $4 \cdot 10^7$  perlas magnéticas anti IgG de ratón (DynaMag, Norway). Luego de la incubación se colocó el eppendorf en el Magneto (DynaMag Magnet, Invitrogen) por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se centrifugó y se resuspendieron las células en 1 ml de solución fisiológica 2% SBF. Con estas células se repitió el proceso de incubación con  $4 \cdot 10^7$  perlas magnéticas. Finalmente luego de los lavados se contaron las células y se verificó el porcentaje de pureza de los linfocitos por citometría de flujo.

#### **2.5. Generación de medio condicionado de monocitos (MCM)**

Los monocitos ( $5 \times 10^4$ /pocillo) obtenidos por selección positiva se incubaron por 24 hs en RPMI 1640-10% FCS en presencia o ausencia de SLPI (4 µg/ml). Luego, las células fueron lavadas dos veces para remover el SLPI e incubadas en RPMI 1640-10 % FCS por otras 24 hs. (37°C). Finalmente, los medios condicionado de monocitos (MCM) se cosecharon se centrifugaron (1200 rpm, 10 min), e inmediatamente se guardaron en alícuotas a - 70°C, hasta su utilización en los experimentos.

Para algunos experimentos los MCM fueron incubados con Ac bloqueantes para IL-6 (1 µg/ml, clon 6708, R&D Systems) e IL-10 (0.5 µg/ml BD Pharmingen, California, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Como control se utilizaron anticuerpos irrelevantes de los mismos isotipos.

## **2.6. Generación de medio condicionado de CDs (MCCDs)**

Los MCCDs se generaron incubando las CDs ( $5 \times 10^4$ /pocillo) durante por 24 hs en RPMI 1640-10% FCS en presencia o ausencia de SLPI (4  $\mu\text{g/ml}$ ). Luego, las células fueron lavadas dos veces para remover el SLPI e incubadas en RPMI 1640-10 % FCS por otras 24 hs. (37°C). Finalmente, los medios condicionado de CDs se cosecharon, se centrifugaron (1200 rpm, 10 min), e inmediatamente se guardaron en alícuotas a  $-70^\circ\text{C}$ .

## **3. CULTIVOS CELULARES**

### **3.1. Cultivo mixto linfocitario (CML)**

Se realizaron ensayos de CML en presencia de concentraciones crecientes de SLPI. Para lo cual, se colocaron en microplacas de 96 pozos (fondo en U, Falcon, New Jersey, USA)  $10^5$  CMSP de dos donantes sanos histoincompatibles en 200  $\mu\text{l}$  de medio RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY, USA), 10% de SBF inactivado (Gibco, MY, USA), Glutamina (2 ng/ml) y Gentamicina (40  $\mu\text{g/ml}$ ). Los cultivos fueron expuestos a distintas concentraciones de SLPI (0.04 - 4  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 5 días (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ). Transcurrido dicho tiempo, se les agregó a cada pozo 1  $\mu\text{l}$  de 3H-Timidina ([methyl- $^3\text{H}$ ] thymidine; 5  $\mu\text{Ci/ml}$ , actividad específica 20 Ci/mmol; Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). Luego de 18 horas se cosecharon las células y se cuantifico la proliferación celular midiendo la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina, utilizando un contador de centello líquido. Los resultados se expresan como % de proliferación siendo el 100 % las C.P.M. obtenidos del CML sin ningún tratamiento. El tratamiento con buffer de dilución es considerado como tratamiento control.

### **3.2. Ensayos de proliferación celular**

En una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo en U se colocaron  $1 \times 10^5$  CMSP resuspendidas en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10 % de suero bovino fetal de complementado (SBF) (Gibco, Grand Island, NY, USA), L-glutamina (2mM) y gentamicina (40  $\mu\text{g/ml}$ ). Las células se trataron simultáneamente con IL-2 (8 ng/ml) y una concentración fija de SLPI (4  $\mu\text{g/ml}$ ) o concentraciones crecientes (0.04 - 4  $\mu\text{g/ml}$ ). En algunos experimentos las CMSP fueron tratadas otras citoquinas como por ejemplo IL-4 (2ng/ml), IL-6(10 ng/ml), IL-10 (0.7

ng/ml) y/o IFN- $\gamma$  (10 ng/ml). Todas estas citoquinas fueron adquiridas a Peprotech (NJ, USA).

Algunos ensayos de proliferación, se realizaron con CMSP depletados de monocitos. En estos casos, se colocaron  $1 \times 10^5$  células en medio completo y se estimularon con IL-2 (8 ng/ml). Dependiendo del tratamiento, estas células fueron cocultivadas con cantidades crecientes de monocitos puros ( $10^3$ - $10^4$ ) o medios condicionados de monocitos o CDs ( $10^4$ ). En otros ensayos de proliferación se utilizó anticuerpo anti-CD3 como mitógeno, en lugar de IL-2. En estos casos, placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano fueron incubadas con sobrenadantes del hibridoma OKT3, productor de anticuerpos anti-CD3, en buffer carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15 mM;  $\text{NaHCO}_3$  34 mM; azida sódica 3 mM) a pH = 9,6 (2 hs, 37 °C). Transcurrido dicho tiempo, se realizaron 2 lavados con solución fisiológica sobre la placa y se agregaron las CMSP resuspendidas en medio 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 SLPI (4  $\mu\text{g/ml}$ ).

Todos los ensayos de proliferación se realizaron incubando las células con los mitógenos durante 5 días, a 37 °C con 5 %  $\text{CO}_2$ . La proliferación se cuantificó por incorporación de timidina tritiada utilizando un contador de centelleo líquido (Wallac 1214 Rackbeta, Turku, WF, Finlandia). Los resultados se expresan como % de proliferación siendo el 100 % las C.P.M. obtenidos de las CMSP estimuladas con el mitógenos y sin ningún tratamiento. El tratamiento con buffer de dilución es considerado como tratamiento control.

### **3.3. Estimulación con Antígeno MTB**

Las CMSP fueron cultivadas bajo las condiciones descriptas, pero con diluciones seriadas de SLPI (0,004-4  $\mu\text{g/ml}$ ), en presencia o ausencia de un lisado de *M. tuberculosis* (5 $\mu\text{g/ml}$ ). Se utilizó un sonicado de *M. tuberculosis*, cepa virulenta H37Rv gentilmente provisto por la Universidad de Colorado (Micobacteria Research Laboratorios, Colorado State University, Fort Collins, CO). Los sobrenadantes de los cultivos fueron cosechados a las 24 y 48hs para determinar en ellos IFN- $\gamma$  mediante un sándwich ELISA.



### 3.4. Cultivo de CMSP con CDs alogénicas

CDs fueron tratadas con Elastasa neutrofílica humana (SIGMA, St. Louis) a una concentración final de 75  $\mu$ M por 3 hs a 37°C. En algunos experimentos también se agregó SLPI (4  $\mu$ g/ml). Luego se recuperaron los medios de cultivo para cuantificar IL-6 y TGF- $\beta$ . En tanto que 10<sup>4</sup> CDs fueron lavadas e incubadas con 10<sup>5</sup> CMSP en presencia de anti-CD3. La proliferación se examinó al 5to día. En otra tanda de experimentos, las CDs se cultivaron con CMSP por 5 días y se cuantificó la expresión de CD4 y FOXP3 por citometría.

## 4. DETERMINACIÓN DE ANTIGENOS

### 4.1. 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<sup>TM</sup>*, 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<sup>TM</sup>*, San Diego, CA, USA), anti-HLA-DR, DP, DQ (MHC II) (IgG2a, R-PE), anti-CD29 (IgG1, R-PE) (*BD Pharmingen<sup>TM</sup>*, 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<sup>TM</sup>*, San Diego, CA, USA), anti-CD4 FITC (BD, CA, USA); CD8 FITC (BD, CA, USA), CD25 PE (*Caltag*, San Francisco, CA, USA), CD3 APC (*eBioscience*), IL-6 PE (IQ), anti-IL-17 PE (*eBioscience*) y anti-Foxp3 (*Caltag Lab*, CA).

### 4.2. Marcaciones de superficie

Las células fueron inmunomarcadas para estudiar la expresión de moléculas de superficie. Para esto, luego del tratamiento adecuado, las células se centrifugaron a 2000 r.p.m., se resuspendieron en PBS frío y luego se realizaron marcaciones directas. Las células se incubaron en frío durante 40 minutos con el anticuerpo de ratón conjugado a un fluorocromo 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.

#### **4.3. Marcaciones intracitoplasmáticas**

Para el análisis del factor de transcripción FOXP3 se realizó una marcación intracelular utilizando el kit de e-Bioscience Inc., junto a una doble marcación directa de superficie para CD4 y CD25 según se detalló anteriormente. Para el análisis de la expresión de IL-6 e IL-17 también se utilizó el kit de e-Bioscience Inc., junto a una doble marcación directa de superficie para CD3. En ambas marcaciones se distribuyeron  $1 \times 10^6$  células por tubo y se realizó una marcación de superficie de tipo directa para CD25 (FITC) y CD4 (PE-Cy5) o CD3 (APC) según se describe más arriba. Luego, las células se lavan con PBS frío, y se resuspenden en el buffer de fijación y permeabilización. Posteriormente, se incubaron a 4°C entre 30-60 minutos y se lavaron con PBS frío. Nuevamente, se volvieron a lavar con buffer de permeabilización y se bloqueó con 2 µl de suero normal de ratón durante 15 minutos en oscuridad, agregándose 7 µl del anticuerpo anti-FOXP3 (PE), 5 µl de anti-IL-6 (PE) o 7 µl de anti-IL-17. Las células se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, se lavaron las células con 1,5ml de buffer de permeabilización y se resuspendieron en PBS. Las células se analizaron por citometría de flujo.

#### **4.4. Detección de células apoptóticas por Anexina V**

CMSP ( $1 \times 10^6$ /pocillo) fueron cultivadas en placas de 6 pocillos durante 48 hs con SLPI (4 µg/ml) en medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) conteniendo L-glutamina (2 mM), gentamicina (40 µg/ml) y 10 % de SFB de complementado (Gibco, Grand Island, NY, USA) a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Los controles positivos de apoptosis fueron cultivados en RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) en ausencia de suero durante el mismo período de tiempo. Las células fueron marcadas utilizando el kit comercial Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™, 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.

#### **4.5. Determinación de Citoquinas Th1/Th2**

Para establecer el efecto del SLPI sobre la producción de citoquinas se utilizó el Kit II de Citoquinas Humanas Th1/Th2 de Beckton Dickinson. El mismo permite cuantificar sobre la misma muestra, mediante una citometría de flujo, la concentración de seis citoquinas: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2. El kit contiene seis poblaciones de partículas con distintas intensidades de fluorescencia para cada citoquina. Se utilizó para cuantificar citoquinas en diferentes medios condicionados y sobrenadantes celulares. Los resultados se analizan con el software Cytometric Bead (Beckton Dickinson, San Diego, CA, USA).

### **5. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS POR ELISA**

#### **5.1. ELISA para la detección de IFN- $\gamma$**

Se adhirió el anticuerpo monoclonal de captura anti IFN- $\gamma$  humano (clon NIB42, 1,25  $\mu\text{g/ml}$ ) (e-Bioscience, San Diego, CA) a la superficie de las placas de 96 pocillos (de alta unión a péptidos) en PBS-BSA 0,1% por 16 hs a 4 °C. Luego se descartó el medio y sin lavar se bloqueó la placa con PBS-BSA 0,1 % (1hr, temperatura ambiente). 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 (2h, temperatura ambiente). Se lavó 3 veces con PBS - Tween-20 (0,05 % - 0,1 %) y se agregó el segundo anticuerpo anti IFN- $\gamma$  humano biotina conjugado (clone 4S.B3, 1,25  $\mu\text{g/ml}$ ) (e-Bioscience, San Diego, CA) en PBS-BSA 0,1% (1hr, temperatura ambiente). Luego de lavar 5 veces, se adicionó la Avidina-HRP (PIERCE Thermo Fisher Scientific LSR, U.S.) y se incubó 30min a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó la placa 5 veces y para el revelado se utilizó 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB, Sigma, St. Louis, MO, USA); la reacción se detuvo con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 rhIFN- $\gamma$  (e-Bioscience, San Diego, CA) mediante diluciones seriadas en PBS-BSA 0,1 %.

## **5.2. ELISA para TGF- $\beta$ 1**

Se midió la concentración de TGF- $\beta$  en los sobrenadantes de cultivo de CMSP mediante ELISA de tipo sándwich. Para este ensayo se diluyó el anticuerpo primario anti TGF- $\beta$  en una solución fosfato alcalina a una concentración final de 5  $\mu$ g/ml (R&D, Minneapolis, MN) y se adsorbió a una placa de ELISA de alto pegado (Falcon, New Jersey, USA) por 18 hs a temperatura ambiente. Luego se lavo la placa con PBS+1% Tween 20<sup>®</sup> y se procedió a bloquear los sitios de pegado no específicos con una solución de 0,5% sacarosa +1% SBF +0,1% azida durante 2 horas a temperatura ambiente. El siguiente paso fue lavar la placa y se agregaron las muestras y una curva patrón de concentración conocida. Luego, se incubó la placa durante otras dos horas a temperatura ambiente, se lavó y se agregó el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. Luego de una incubación de 2 horas a temperatura ambiente se lavó y se procedió al revelado con el agregado de 25  $\mu$ l por pocillo de O-phenylenediamine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), luego de 10 a 30 minutos al abrigo de la luz la reacción se detuvo con 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> registrándose la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA.

## **6. WESTERN BLOT**

### **6.1. Detección de I $\kappa$ B- $\alpha$**

CMSP (10<sup>5</sup> /pocillo) fueron estimuladas con IL-2 (8 ng/ml) y tratadas con SLPI (4ug/ml) durante 2 hs y luego se preparan extractos celulares totales. Las células fueron lavadas y solubilizadas en solución de lisis (CHAPS 1% en TBS, Sigma-Aldrich y Cocktail Inhibidor de Proteasas, Sigma-Aldrich) 1h a 4°C. Luego de centrifugar los extractos (12,000 g, 15min, 4 °C), las proteínas fueron luego cuantificadas utilizando el kit de microBCA (PIERCE Thermo Fisher Scientific LSR, U.S.). Cantidades equivalentes de proteína fueron sembradas y corridas en geles de poliacrilamida-bisacrilamida al 6% en presencia de SDS, luego transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, GE Healthcare) y finalmente incubadas en presencia del anticuerpo específico I $\kappa$ B- $\alpha$  (C-21, Santa Cruz Biotechnology, CA), o anti- $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotech). Luego de sucesivos lavados, se

realizó el revelado del anticuerpo unido específicamente utilizando anticuerpos policlonales anti-conejo conjugados con peroxidasa (HRP) (Chemicon International, MA) y se revela mediante quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare) y placas Kodak BioMax. Finalmente, el resultado se analizó por densitometría utilizando el programa Image J.

## **6.2. Detección de T-bet y GATA-3**

Para la detección de T-bet y GATA-3, las CMSP ( $10^5$ /pocillo) fueron estimuladas según que experimento con IL-2 (8 ng/ml), *M. tuberculosis* ( $5\mu\text{g/ml}$ ), IL-4 (2 ng/ml) y SLPI ( $4\mu\text{g/ml}$ ) durante 4 días o 24hs. Luego se preparan extractos celulares totales y se procede como se describió anteriormente; en este caso utilizando los anticuerpos específicos para T-bet (Santa Cruz Biotechnology, CA), GATA-3 (Santa Cruz Biotechnology, CA) o anti- $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotech). Luego de sucesivos lavados, se realizó el revelado del anticuerpo unido específicamente utilizando respectivamente anticuerpo policlonal anti-ratón conjugado con peroxidasa (HRP) (Chemicon International, MA) y policlonal anti-conejo conjugado con peroxidasa (HRP) (Chemicon International, MA). Finalmente, se procede a realizar el revelado mediante quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare) y placas Kodak BioMax.

## **7. SISTEMA DE ENTRAMPAMIENTO DE SLPI**

### **7.1. Preparación de microesferas conteniendo SLPI**

Las microesferas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) (PM: 14.000, Sigma, St. Louis, MO, USA) conteniendo SLPI 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 SLPI ( $A_1$ ) 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.

## **7.2. Ensayos de liberación**

Treinta miligramos de microesferas se suspendieron en 300 ul de PBS a 7,4 pH. Las muestras fueron incubadas a 4° y 37° centígradas y se vortexearon para resuspender las microesferas. Para evaluar la proteína liberada, los tubos se centrifugaron y el sobrenadante fue removido; se rellenaron los tubos con 300 ul de PBS fresco y se colocaron a la temperatura seleccionada. Las muestras se tomaron en intervalos específicos de tiempo durante 40 días. Para determinar la cantidad de SLPI liberado se realizó un ensayo de ELISA.

## **7.3. Actividad biológica del SLPI entrampado**

CMSP fueron sembradas en la cámara inferior de una placa de 24 pocillos y estimuladas con IL-2 (8 ng/ml). En una cámara superior se colocaron 10 mg de microesferas de SLPI o microesferas control. Ambas cámaras fueron separadas por un filtro de policarbonato con un tamaño de poro de 0.4 µm. Al 5to día se incorpora un pulso de 18 hs de [3H]-thymidine en la cámara inferior.

## **8. EXPERIMENTOS *IN VIVO***

### **8.1. Animales**

Para los experimentos *in vivo*, se trabajó con ratones hembras BALB/c o C57/B6 de ocho semanas de edad obtenidas del 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. Además se utilizaron ratas machos adultos Sprague–Dawley obtenidas del Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Todos los animales fueron mantenidos de acuerdo con las normas del NIH para el cuidado y uso de animales de experimentación

## **8.2. Orquitis Autoinmune Experimental (EAO)**

El cuadro de orquitis se logra inmunizando ratas machos adultos Sprague–Dawley con un homogenato testicular (TH). El TH se obtiene mediante el disgregado mecánico de los testículos de ratas Sprague-Dawley en una solución salina con el mixer Omni por 30 segundos. La concentración final del TH alcanzada fue de 500 mg/ml. Un total de 0.4 ml de TH fueron emulsionados con 0.4 ml de adjuvante complete de Freund's (CFA) y se utilizaron para las inmunizaciones. Los animales recibieron tres inmunizaciones, la primera al día 0 del protocolo y luego con un intervalo de 14 días. En la inmunización, se inyectó 0.8 ml del TH emulsionado de forma intradérmica en la almohadilla plantar y en múltiples sitios cercanos a ganglios regionales. Para analizar el efecto del SLPI en el modelo se realizaron dos esquemas para la administración de la micropartículas cargadas con SLPI. Para el esquema 1 se administró desde el día 0 y cada semana 100 mg de micropartículas con SLPI o Micropartículas Control de forma subcutánea. Para el esquema 2 se administraron las micropartículas SLPI o control a partir del día 35 y luego en los días 42 y 49. Finalmente los animales fueron sacrificados y pesados al día 56. Los testículos fueron fijados con solución de Bouin's y embebidos en parafina para determinar la histopatología. Además se obtuvieron los ganglios linfáticos renales, iliacos, poplíteos e inguinales y los bazo para analizar la proliferación linfocitaria. Dos días antes de ser sacrificados los animales fueron estimulados en la pata con 0,1 ml del TH y se cuantificó la respuesta de hipersensibilidad retardada a las 24 y 48 hs midiendo la inflamación de la pata con un microcalibre.

## **8.3. Obtención de esplenocitos y ganglios linfáticos de ratas**

Para obtener los esplenocitos y linfocitos de ganglios linfáticos, se sacrificaron las ratas adultas Sprague-Dawley y se extrajo el bazo, los ganglios poplíteos, inguinales, iliacos y renales. Posteriormente, fueron disgregado por un lado los ganglios y por el otro el bazo 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). Las células obtenidas 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  $8 \times 10^7$  células que se cultivaron en RPMI 1640 (Gibco,

Grand Island, NY, USA), suplementado con 5 % de suero bovino fetal decomplementado (SBF) (Gibco, Grand Island, NY, USA), L-glutamina (2mM) y gentamicina (40 µg/ml) a 37 °C en estufa con 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **8.4. Proliferación celular**

510<sup>5</sup>/pocillo células obtenidas de los ganglio linfáticos o del bazo fueron cultivadas en placa de 96 pocillos con fondo en U en 200 µl de medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA), suplementado con 5 % de suero bovino fetal decomplementado (SBF) (Gibco, Grand Island, NY, USA), L-glutamina (2mM) y gentamicina (40 µg/ml) a 37 °C en estufa con 5 % CO<sub>2</sub>. Las células fueron estimuladas con ConA (15 µg/ml) o TH (5 µg/ml) y se cuantificó la incorporación de timidina a los 3 días con un pulso de 18 hs de [3H]-thymidine.

#### **8.5. Modelos de hipersensibilidad retardada (HSR)**

La hipersensibilidad por contacto se indujo en ratones BALB/C. En un primer modelo se pintó la piel del lomo rasurado de los animales con 20 µl de 2% 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB) en acetona. Nueve días después los animales fueron desafiados en ambas orejas con 10 µl de DNCB 0,05% o acetona como control. En el otro modelo de hipersensibilidad se sensibilizaron ratones BALB/C (H-2Kd) por la administración de 10<sup>7</sup> linfocitos obtenidos del bazo y ganglios linfáticos de ratones C57/B6 (H-2Kb). Las células fueron inyectadas de forma intradérmica en el vientre de los BALB/C. Siete días después los animales fueron desafiados por la inyección en las orejas de 10<sup>6</sup> linfocitos de C57/B6 o células singeneicas de ratones BALB/C. Para ambos modelos un grupo de ratones recibieron la administración subcutánea de SLPI 10 µg/día, tres días antes de la sensibilización y todos los días del protocolo experimental. El grupo de animales control recibió buffer de dilución. La inflamación se evaluó con un microcalibre a las 24 y 48 hs. Los resultados representan la media de la diferencia en grosor entre la oreja que recibió el estímulo y la oreja que recibió el control.



## **8.6. Modelo de trasplante de piel**

Se utilizaron animales que presentan incompatibilidad en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. Los animales fueron anestesiados con una combinación apropiada de ketamina-xilacina. Los animales receptores BALB/c(H-2K<sup>d</sup>) hembra de 8 semanas se les rasuro un área aproximada de 10 cm<sup>2</sup> en el lomo y se realizó un implante de piel obtenida de la oreja de los ratones dadores C57/B6 (H-2K<sup>b</sup>). El implante se cubrió con un aposito protector y una cinta hipoalergénica para prevenir que los animales se muerdan en la zona. En el día de la operación se agregaron 20 µg de SLPI o buffer en el sitio del implante. En los animales receptores se administró de forma s.c. en el lomo 10 µg de SLPI en 100 µl de volumen 3 días antes de la operación y todos los días durante el experimento o buffer de dilución como control. Finalmente al 6to día se retiraron los apositos protectores y se evaluó el grado de rechazo del trasplante. Se considero rechazo cuando el área necrosada superó el 70% del implante.

## **9. ESTUDIOS CON MUESTRAS DE PACIENTES**

### **9.1. Características de los pacientes y criterios**

Cincuenta y cinco pacientes se enrolaron en este estudio luego de habernos otorgado un consentimiento informado de acuerdo a la Declaración de Helsinki y el protocolo fuera aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas “José de San Martín”. Los criterios de inclusión y exclusión se muestran en la Tabla 2. Diecisiete pacientes (edades 49-78) fueron diagnosticados con EPOC, veintitrés (edades 49-83) fueron diagnosticados con cáncer de pulmón y quince dadores sanos (edades 41-83) donaron sangre para este estudio (Tabla 3). Las muestras de sangre de pacientes con cáncer de pulmón y EPOC fueron obtenidas previas a cualquier tratamiento o durante un ensayo de rutina respectivamente.

CRITERIOS DE INCLUSION	CRITERIOS DE EXCLUSION
<ul style="list-style-type: none"> <li>Sujetos normales, ex fumadores, fumadores, pacientes con EPOC de acuerdo a la definición del consenso ATS-ERS, pacientes con cáncer de pulmón.</li> <li>Estado estable de la enfermedad</li> <li>Capacidad para realizar la recolección de aire espirado y las pruebas diagnosticas para definir la cohorte.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Con morbilidades severas: IC – Diabetes, alteraciones de la marcha</li> <li>Asma</li> <li>Infarto de miocardio en los 4 últimos meses</li> <li>Angina inestable</li> <li>Insuficiencia cardíaca congestiva</li> <li>Diabetes mellitus</li> <li>Infección activa</li> <li>Infección HIV</li> </ul>

**Tabla 2.** Criterio de inclusión y exclusión utilizado en el estudio.

Dadores Sanos			Pacientes con EPOC				Pacientes con Cáncer de Pulmón				
Nº	Edad (años)	Sexo	Nº	Edad (años)	Sexo	EPOC Estadio	Nº	Edad (años)	Sexo	Cancer Estadio	EPOC Estadio
1	83	F	1	75	M	III	1	71	M	ND*	-
2	67	M	2	55	F	II	2	59	M	ND	-
3	74	F	3	70	F	III	3	66	M	I	-
4	45	F	4	49	M	IV	4	75	M	I	I
5	71	F	5	65	M	III	5	76	M	IV	-
6	77	F	6	65	M	IV	6	64	F	II	IV
7	57	F	7	56	M	II	7	59	M	IV	II
8	61	F	8	59	F	III	8	59	M	ND	-
9	54	F	9	65	F	IV	9	73	F	ND	-
10	41	M	10	67	M	IV	10	76	M	ND	II
11	78	M	11	62	M	II	11	65	F	ND	-
12	55	F	12	69	M	IV	12	71	M	IV	III
13	61	F	13	65	M	I	13	53	M	IIIA	-
14	48	F	14	74	M	II	14	74	M	II	III
15	54	F	15	78	M	IV	15	49	F	IV	III
			16	55	F	III	16	83	M	ND	-
			17	77	M	I	17	61	F	ND	-
							18	71	M	ND	-
							19	72	M	ND	-
							20	58	F	I	II
							21	50	F	ND	-
							22	50	M	ND	III
							23	78	F	IIB	II

**ND=No Determinado**

**Tabla 2.** Muestras utilizadas para el estudio.

## 9.2. Proliferación de CMSP

La proliferación celular fue determinada por la incorporación de 3H-Timidina. CMSP ( $10^5$ /pocillo) de pacientes con cáncer de pulmón y EPOC fueron sembradas en placas de 96 pocillos fondo en U con 200  $\mu$ l de medio completo y estimuladas con IL-2 (8 ng/ml). Un conjunto de dadores sanos fue usado como patrón y el índice de proliferación (IP) se calculo con la siguiente fórmula:

$$IP = \frac{\text{prol. Pacientes con IL-2} - \text{prol. Pacientes sin IL-2}}{\text{prol. patrón con IL-2} - \text{prol. patrón sin IL-2}}$$

A los 5 días de cultivo se agregó a cada pocillo 1  $\mu$ l de 3H-Timidina ([methyl- $^3$ H] thymidine; 5  $\mu$ Ci/ml, actividad específica 20 Ci/mmol; Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). Luego de 18 horas se cosechan las células y se cuantifica la proliferación celular midiendo la incorporación de 3H-Timidina, utilizando un contador  $\beta$  de centello líquido.

## 9.3. ELISA para estudiar los niveles de SLPI

El nivel de SLPI plasmático se determinó utilizando un ELISA sándwich. Primero se adhirió un anticuerpo monoclonal de ratón anti-SLPI humano (IgG1, 1  $\mu$ g/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 plasma (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  $\mu$ g/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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 SLPI producido y purificado en nuestro laboratorio.

**10. 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 cada figura. La comparación entre grupos en los estudios *in vivo* fue realizada utilizando el test *t* de Student y Mann-Whitney para datos no apareados. La correlación se analizó con un test de Spearman's. Se consideró como significativo un valor de  $p < 0,05$  (\*), y como altamente significativo un valor de  $p < 0,01$  (\*\*), y  $p < 0,005$  (\*\*\*)).

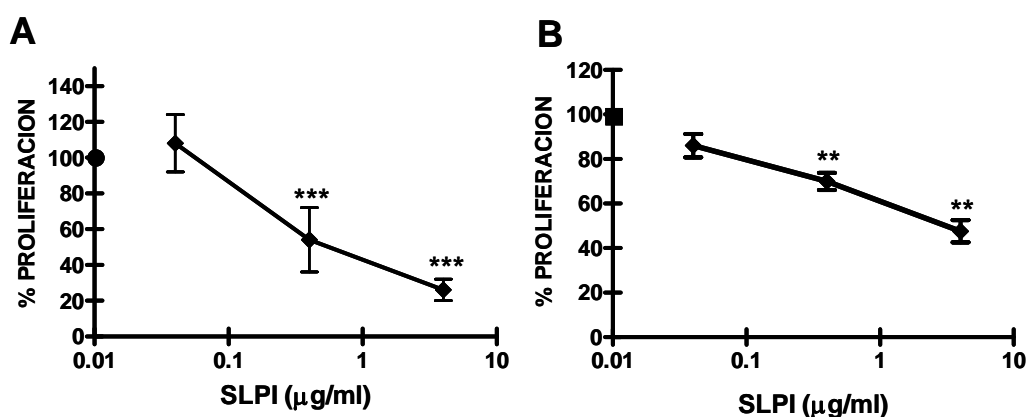
## RESULTADOS

### 1. ACTIVIDAD DEL SLPI SOBRE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

Como se mencionó en la introducción, la principal función del SLPI es la de actuar como un anti-inflamatorio bloqueando la actividad proteolítica de las serino proteasas liberadas por los leucocitos y antagonizando la acción del LPS<sup>117, 151, 152, 153</sup>. Sin embargo, el papel del SLPI en la respuesta inmune adaptativa todavía no se ha sido elucidado. Por lo tanto, el primer objetivo fue determinar la capacidad del SLPI de modificar la proliferación linfocitaria en respuesta a diferentes mitógenos.

#### 1.1. Efecto del SLPI sobre la proliferación linfocitaria

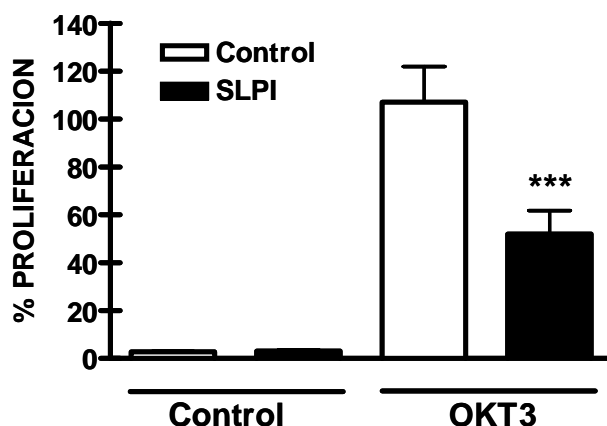
En primer lugar se analizó la actividad del SLPI en un CML. Para ello, CMSP de dos dadores sanos fueron incubados durante 5 días en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de SLPI. La figura 11A muestra que el SLPI disminuyó la proliferación celular de manera dosis dependiente. Luego, se analizó la capacidad del SLPI de modificar la proliferación linfocitaria inducida con IL-2. En este caso, CMSP de un único dador sano fueron incubadas en presencia o ausencia de IL-2 y SLPI. En la Figura 11B se observa que el SLPI también disminuyó la proliferación celular inducida con IL-2 de manera dosis dependiente.



**Figura 11. El SLPI inhibe la proliferación linfocitaria.** (A) CMSP ( $10^5$  /pocillo) de dos dadores sanos se incubaron por 5 días en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de SLPI (0.04, 0.4 o 4 µg/ml). (B) CMSP de un dador sano se incubaron en presencia de IL-2 (8 ng/ml) y de

diferentes concentraciones de SLPI. Tanto para (A) como para (B), luego de 5 días de incubación, la proliferación se cuantificó por incorporación de  $[3H]TdR$  durante las últimas 18 hs del cultivo. La proliferación en ausencia de SLPI fue de  $99 \pm 2.7\%$  en (A, ●) y  $98 \pm 3.5\%$  en (B, ■). Los datos se expresan como medias  $\pm$  ESM del porcentaje de proliferación de doce experimentos diferentes para (A) y para (B). \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . ANOVA pos hoc Dunnett para comparaciones múltiples.

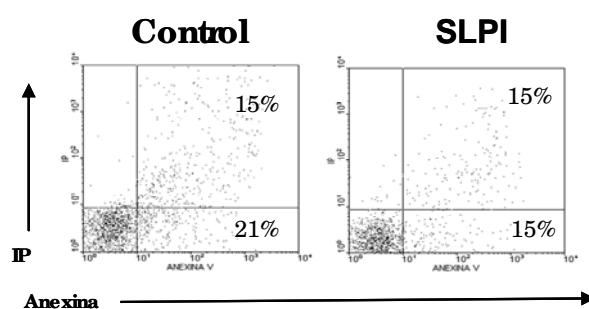
Luego se analizó la capacidad del SLPI de modificar la proliferación celular inducida con el anticuerpo OKT3 (anti-CD3). Este anticuerpo es un reconocido mitógeno específico para linfocitos T. Para ello, CMSP fueron tratadas con el anticuerpo OKT3, en presencia o ausencia de SLPI, tal como se describe en Materiales y Métodos. En la Figura 12 se observa que el SLPI disminuyó significativamente la proliferación linfocitaria inducida por el tratamiento con OKT3. Este resultado sugiere que el SLPI inhibe la proliferación de linfocitos T.



**Figura 12. El SLPI inhibe la proliferación de linfocitos T.** CMSP ( $10^5$  /pocillo) se cultivaron por 5 días en presencia de OKT3 (2 ng/ml) o de un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo (grupo control). Ambo grupos (control y OKT3) fueron tratados o no con 4  $\mu$ g/ml de SLPI. La proliferación se cuantificó por incorporación de  $[3H]TdR$  durante las últimas 18 hs del cultivo. Los datos se expresan como medias  $\pm$  ESM del porcentaje de proliferación relativo al control de proliferación de 4 experimentos. \*\*\* $p < 0.001$  ANOVA pos hoc Dunnett para comparaciones múltiples.

Para descartar la posibilidad de un efecto tóxico del SLPI sobre los linfocitos, se estudió la presencia de apoptosis y necrosis en linfocitos estimulados con un mitógeno (PHA), tratados o no con SLPI. En estos experimentos, como la idea era ver un efecto tóxico

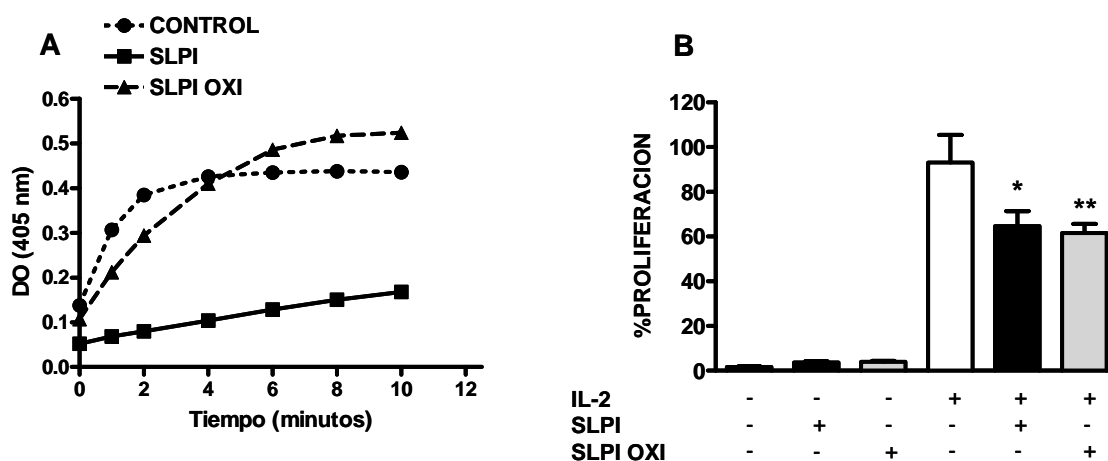
directo del SLPI sobre los linfocitos, el agregado de SLPI se hizo a las 48 hs post-estimulación con PHA y la presencia de apoptosis y/o necrosis se evaluó realizando un ensayo de anexina e Ioduro de Propidio. En la Figura 13 se observa que el SLPI no modifica significativamente la apoptosis ni la necrosis de los linfocitos, sugiriendo que el efecto del SLPI sobre la proliferación de linfocitos no se debe a un efecto tóxico del SLPI.



**Figura 13. SLPI no produce apoptosis ni necrosis de linfocitos.** CMSP fueron estimuladas con PHA (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) por 48 hs, luego se agregó SLPI (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o Buffer (Control) y se incubó durante 24 horas más. Las células fueron marcadas utilizando el kit comercial Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™) y la apoptosis fue medida con un equipo FACSCalibur. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa WinMDI para Windows versión 2.9. Se muestra un experimento representativo de tres.

Varias de las actividades descriptas para el SLPI no dependen de su actividad inhibitoria sobre las serino proteasas. Para determinar si la actividad inhibitoria del SLPI sobre la proliferación linfocitaria podría ser dependiente o no de la actividad anti-serino proteasa, se generó un SLPI con sus residuos de metionina oxidados (SLPI OXI), tal como se describe en la sección Materiales y Métodos. Luego, se evaluó la actividad anti-serino proteasa del SLPI OXI. Este ensayo se basa en la inhibición del clivaje del sustrato inducido por una serino proteasa (tripsina). Como se observa en la Figura 14A, el SLPI inhibe la acción enzimática de la tripsina, impidiendo que esta actúe sobre el sustrato. En la misma figura también se observa que el SLPI OXI es incapaz de inhibir la actividad de la tripsina, indicando que SLPI oxidado ha perdido su actividad inhibitoria sobre las serino proteasas (Figura 14A). Finalmente se probó el efecto del SLPI OXI sobre la proliferación de CMSP

inducida con IL-2. En la Figura 14B, se observa que el efecto inhibitorio del SLPI sobre la proliferación linfocitaria se mantiene aún con el SLPI OXI, sugiriendo que el efecto del SLPI sobre la proliferación linfocitaria no depende de su actividad anti serinoproteasa.



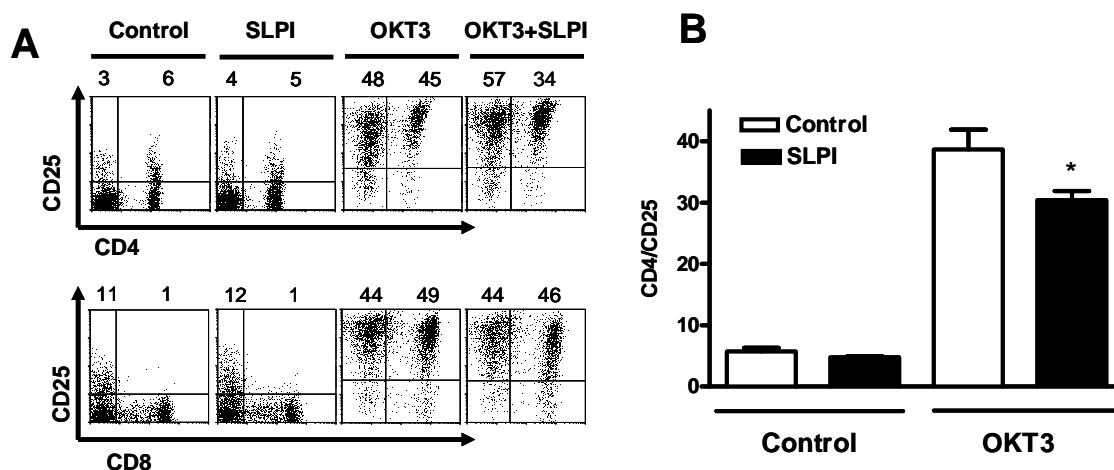
**Figura 14. La inhibición de la proliferación linfocitaria es independiente de la actividad anti-proteasa.** (A) Se preincuba tripsina (0,02 - 0,05 %) junto con SLPI o SLPI OXI por 15min a 37°C y luego se agrega el sustrato cromogénico. El producto del clivaje del sustrato por acción de la tripsina se detecta por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA. Se grafica un ensayo representativo de tres. (B) CMSP ( $10^5$ /pocillo) se cultivaron por 5 días en presencia de IL-2 (8 ng/ml). Los cultivos fueron tratados con 4  $\mu$ g/ml de SLPI o SLPI OXI. La proliferación se cuantificó por incorporación de [ $^3$ H] TdR durante las últimas 18 hs. del cultivo. Los datos se expresan como medias  $\pm$  ESM de tres experimentos diferentes. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . ANOVA pos hoc Dunnett para comparaciones multiples.

## 1.2. Efecto del SLPI sobre la activación linfocitaria

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, el siguiente objetivo fue determinar el efecto del SLPI sobre la activación de los linfocitos T. En particular se analizó la expresión del receptor de alta afinidad para IL-2 (CD25) en CMSP estimuladas con OKT3, en presencia o ausencia de SLPI. En la Figura 15 se observa que el agregado de SLPI en el cultivo no afectó los niveles de expresión de CD25 en linfocitos no estimulados con OKT-3. En la misma figura se observa que el agregado de OKT3 aumenta la expresión de CD25 en los linfocitos CD4 y CD8. Sin embargo, el agregado de SLPI a los linfocitos estimulados con OKT3, sólo disminuyó significativamente el número de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Figura 15).

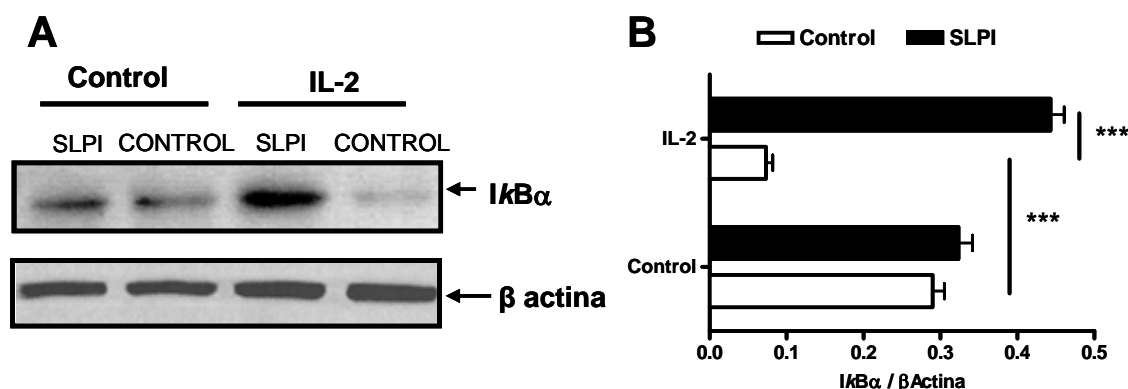


Este resultado sugiere que el SLPI modifica la activación linfocitaria específicamente sobre la población T CD4 colaborador.



**Figura 15. SLPI disminuye la expresión de CD25 en linfocitos CD4<sup>+</sup>.** CMSP fueron estimuladas o no por 48 hs con OKT3 en presencia o ausencia de SLPI (4  $\mu$ g/ml). Luego, las células fueron cosechadas y marcadas con anti-CD25 mAb-PE y CD4-FITC o CD8-FITC y analizadas por citometría de flujo. (A) Experimento representativo. (B) Se representa la Media  $\pm$  ESM de cuatro experimentos independientes únicamente para la población CD4<sup>+</sup>. \*p < 0.05 ANOVA pos hoc Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

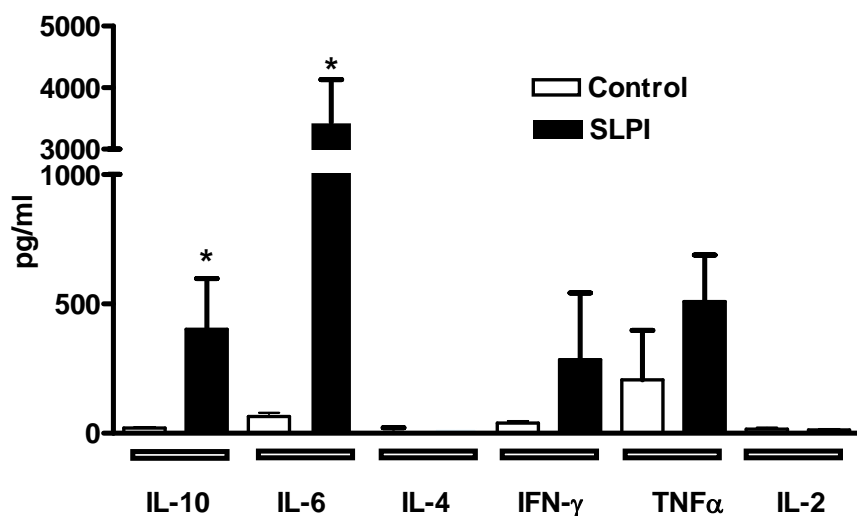
Se ha propuesto que la actividad anti inflamatoria del SLPI también está mediada por la inhibición de la degradación proteolítica de I $\kappa$ B y de la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B<sup>154,155</sup>. Por lo tanto, el siguiente paso fue estudiar la capacidad del SLPI de modificar los niveles de I $\kappa$ B en los CMSP estimuladas con IL-2. En la Figura 16 se observa que la IL-2 disminuyó significativamente los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$ . La sola presencia de SLPI en los cultivos incrementó los niveles basales de I $\kappa$ B $\alpha$  y revirtió la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  inducida por IL-2 (Figura 16). Estos resultados sugieren que el SLPI inhibe la activación linfocitaria a través de la inhibición de la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B.



**Figura 16. SLPI inhibe la degradación de IκBα.** CMSP ( $10^5$ /pocillo) fueron tratadas con IL-2 (8 ng/ml) y SLPI (4 μg/ml) durante 15 min. Luego las células fueron incubadas una hora en hielo con buffer de lisis. Se cuantificó la concentración de proteínas totales por el método de Micro BCA™. Los lisados celulares se sembraron en las calles con una concentración de proteínas de 15 μg en un gel de 15 % SDS-PAGE. Los Western blot se revelaron con un anticuerpo policlonal IκBα y otro anticuerpo para β actina. (A) Experimento representativo. (B) Densitometría de las bandas de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como medias ± ESM. \*\*\* $p < 0.001$  ANOVA pos hoc Dunnett para comparaciones múltiples.

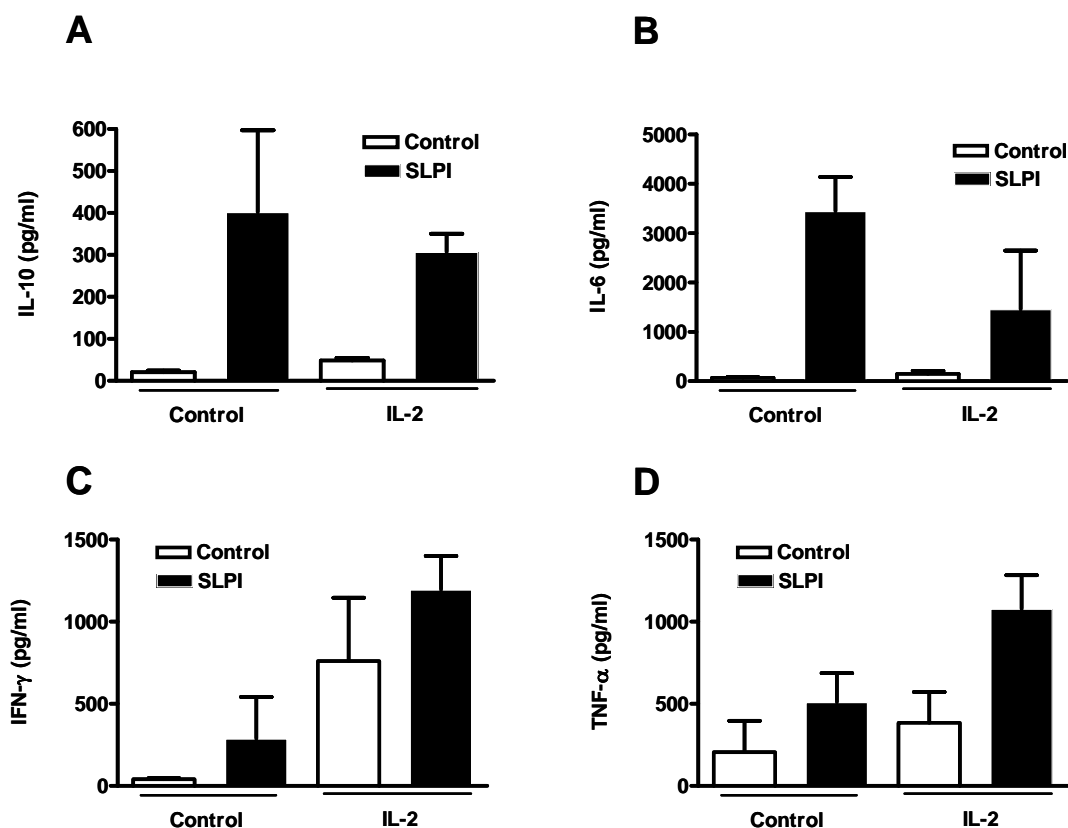
### .3. Efecto del SLPI sobre la diferenciación linfocitaria

La diferenciación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> hacia los distintos perfiles T colaboradores es un proceso crucial de la inmunidad adaptativa que define el tipo de respuesta frente a patógenos, y en muchos casos está involucrada en la patogénesis de enfermedades mediadas por el sistema inmune. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue evaluar la capacidad del SLPI para direccionar el perfil de respuesta T. Para lo cual, se examinó la expresión de citoquinas características del perfil Th1 (IFN-γ, TNF-α e IL-2) y del perfil Th2 (IL-10, IL-6 e IL-4) en sobrenadantes de cultivo de CMSP incubados durante cinco días en presencia de SLPI y en ausencia de mitógenos. En la figura 17 se observa que el agregado de SLPI aumentó significativamente la producción de IL-10 e IL-6, pero no de IL-4 e IL-2. También se observa un aumento de las citoquinas IFN-γ y TNF-α, que no fueron estadísticamente significativas.



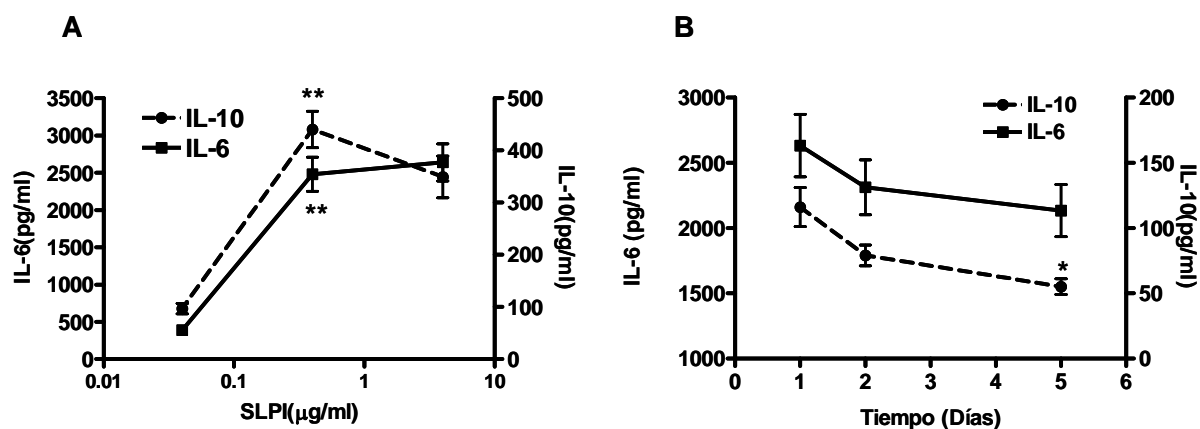
**Figura 17. SLPI modifica la producción de citoquinas del perfil Th1/Th2** En sobrenadantes de cultivo de CMSP estimulados con SLPI (4  $\mu$ g/ml) durante cinco días se midió la concentración de las distintas citoquinas mediante citometría de flujo utilizando el Kit II de Citoquinas Humanas Th1/Th2 de Beckton Dickinson. Las barras representan las medias  $\pm$  ESM de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados utilizando el test de Student-Newman-Kule; \* $p$ <0.05.

El siguiente paso fue evaluar si el efecto del SLPI sobre la producción de citoquinas se mantenía aun en presencia de una citoquina característica del perfil Th1 como es IL-2. Para este ensayo se utilizaron CMSP obtenidas a partir de un donante sano que se incubaron con SLPI (4  $\mu$ g/ml) e IL-2 (8 ng/ml) durante cinco días. En la figura 18 se observa que la presencia de IL-2 genera una tendencia hacia la reversión del efecto provocado por el SLPI sobre IL-10 e IL-6 (Figura 18 A y B). Mientras que en el caso de las citoquinas de perfil Th1, como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , la presencia de IL-2 produce un ligero aumento en la expresión de las mismas tanto en linfocitos tratados o no con SLPI (Figura 18 C y D). Sin embargo, en ninguno de estos casos, las diferencias fueron estadísticamente significativas.



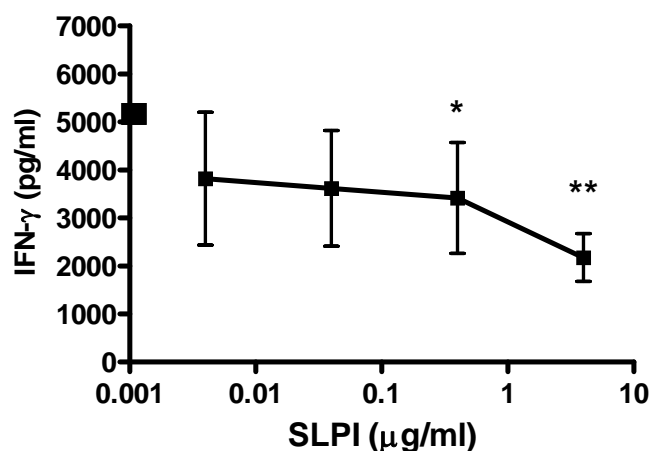
**Figura 18. El agregado de SLPI no modifica sustancialmente el patrón de citoquinas inducido por IL-2.** En sobrenadantes de cultivo de CMSP estimulados con IL-2 y tratadas con SLPI (4  $\mu\text{g/ml}$ ) durante cinco días se midió la concentración de las distintas citoquinas mediante citometría de flujo utilizando el Kit II de Citoquinas Humanas Th1/Th2 de Beckton Dickinson. Las barras representan las medias  $\pm$  ESM de 2 experimentos independientes. A) IL-10; B) IL-6; C) IFN- $\gamma$ ; D) TNF- $\alpha$ . Los datos fueron analizados utilizando el test de Student-Newman-Kule.

En una instancia posterior, se profundizó los estudios del efecto del SLPI sobre la producción de citoquinas. Para lo cual se realizaron curvas de dosis respuesta y cinéticas de la producción de citoquinas en los CMSP tratados solamente con SLPI. Como se observa en la Figura 19A, el SLPI *per se* aumentó los niveles de IL-6 e IL-10 de manera dosis dependiente a los 5 días, alcanzándose un plateau con 0,4  $\mu\text{g/ml}$  de SLPI. Además, este efecto del SLPI sobre la producción de IL-6 e IL-10 disminuye en función del tiempo, teniendo un máximo de producción a las 24 hs (Figura 19B). No se observaron cambios en los niveles de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-2 (dato no mostrado).



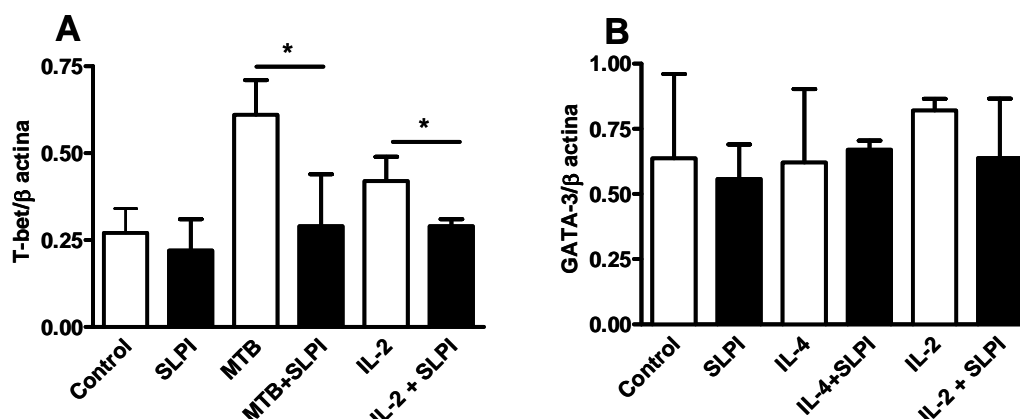
**Figura 19. SLPI aumenta IL-10 e IL-6 de forma dosis y tiempo dependiente.** (A) En sobrenadantes de cultivo de CMSP estimulados con concentraciones crecientes de SLPI (0.04, 0.4 o 4 μg/ml) durante cinco días se midió la concentración de las distintas citoquinas. (B) En sobrenadantes de cultivo de CMSP estimulados con SLPI (4 μg/ml) a lo largo de cinco días se midió la concentración de las distintas citoquinas. Se utilizó el Kit II de Citoquinas Humanas Th1/Th2 de Beckton. Los datos se expresan como medias ± ESM de tres experimentos diferentes. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . ANOVA pos hoc Dunnett para comparaciones múltiples.

Los resultados obtenidos, muestran claramente que el SLPI no induce una respuesta de tipo Th1, ya que no hay un incremento de IFN- $\gamma$ , y que tiene una tendencia a inducir citoquinas más vinculadas al perfil Th2, a pesar de no observar aumentos en la producción de IL-4. Por lo tanto, se hipotetizó que el SLPI tendría una actividad moduladora pero no inductora de los diferentes perfiles de citoquinas. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la actividad del SLPI en respuesta a un potente inductor de respuestas de tipo Th1 como *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Para lo cual, se determinó la producción de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo de CMSP tratados con un lisado de MTB en presencia o ausencia de SLPI. En la Figura 20 se observa que el agregado de 0.4 y 4 μg/ml de SLPI disminuyó significativamente los niveles de IFN- $\gamma$  inducidos por el antígeno en los sobrenadantes de las células a las 24hs. La inhibición sobre los niveles de IFN- $\gamma$  se observó aún cuando el antígeno se colocó 30 minutos antes o 30 minutos después del agregado del SLPI (datos no mostrados).



**Figura 20. SLPI disminuye la producción de IFN- $\gamma$ .** Curva dosis respuesta de SLPI sobre la producción de IFN- $\gamma$ . Mediante sándwich ELISA se determinó los niveles de IFN- $\gamma$  (pg/ml) en sobrenadante de CMSP estimuladas con un lisado de *M. tuberculosis* H37Rv (5 $\mu$ g/ml) y tratadas con SLPI (0.004; 0.04; 0.4 y 4  $\mu$ g/ml) durante 24hs. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM de seis experimentos independientes. ■ Valor de IFN- $\gamma$  en el control=MTB+Buffer. \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01 Test t de Student para datos no apareados.

EL siguiente paso fue analizar la capacidad del SLPI de modificar los niveles de los factores de transcripción T-bet y GATA-3. Para lo cual CMSP fueron tratadas con MTB, IL-2 o IL-4 en presencia o ausencia de SLPI, cuantificándose los niveles de estos factores de transcripción por Western Blot. En la Figura 21A se observa que el lisado de MTB e IL-2 aumentan los niveles de T-bet. Sin embargo, este aumento no se observa cuando el SLPI se encuentra en los cultivos. Cuando se analizaron los niveles de expresión de GATA-3, ninguno de los tratamientos pudo modificar los niveles basales de este factor de transcripción (figura 21B). Esta última serie de resultados muestran que el SLPI claramente disminuye los marcadores típicos del perfil Th1, sin alterar el patrón Th2.



**Figura 21. SLPI inhibe la expresión de T-bet.** CMSP fueron tratadas con IL-2 (8 ng/ml), IL-4 (2 ng/ml), MTB (un lisado de *M. tuberculosis* H37Rv (5µg/ml)) y SLPI (4 µg/ml) por 5 días según se indica en la figura. Luego, las células se lisaron mediante la incubación por una hora con buffer de lisis en hielo. Las proteínas se cuantificaron por el ensayo de Micro BCA™. Los lisados celulares con cantidades equivalentes de proteínas (17 µg/calle) se sembraron en un gel de 12 % SDS-PAGE. Los Western blot se analizaron por quimioluminiscencia con un anticuerpo policlonal para T-bet(A), GATA-3 (B) y β actina(A y B). Los datos se expresan como medias ± ESM de la densitometría de las bandas de tres experimentos independientes. \*p<0.05 ANOVA pos hoc Dunnett Comparaciones múltiples.

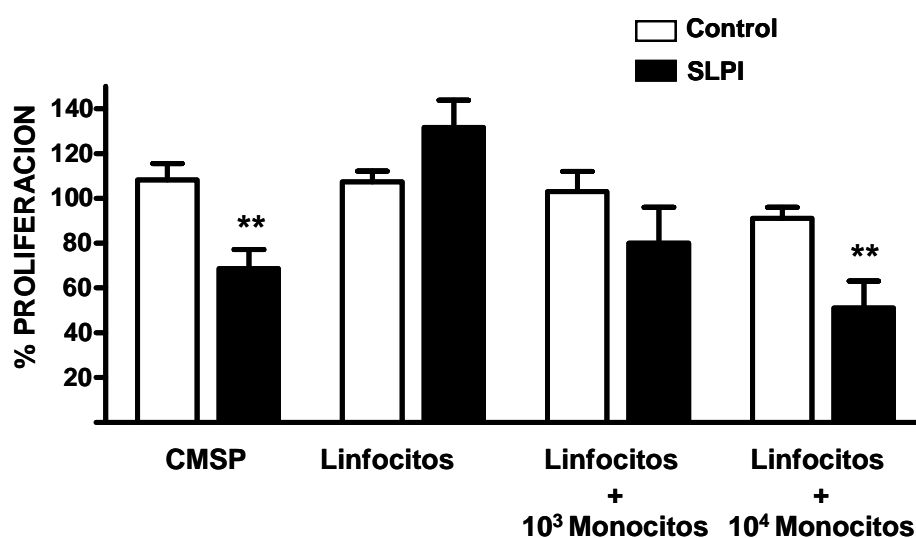
## 2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL SLPI

Los resultados hasta aquí presentados muestran claramente una actividad inhibitoria del SLPI sobre la proliferación linfocitaria y sobre la producción de IFN-γ. Estos resultados son llamativos ya que hasta el momento sólo se habían descrito acciones directas del SLPI sobre monocitos y macrófagos, pero no sobre los linfocitos. En esta sección se describen experimentos que tratan de caracterizar el efecto del SLPI sobre los linfocitos.

### 2.1. Efecto del SLPI sobre los monocitos

Los experimentos hasta aquí descritos, fueron realizados con CMSP. Es decir que el efecto inhibitorio del SLPI bien podría ser directo sobre los linfocitos o indirecto al actuar sobre monocitos presentes en los cultivos. Para probar la presencia de un efecto directo del SLPI sobre linfocitos, las CMSP fueron depletadas de monocitos, y las células restantes (mayoritariamente linfocitos) fueron incubadas con IL-2 y SLPI. En este caso, el SLPI no

modificó la proliferación celular (Figura 22), sugiriendo que el efecto del SLPI dependía de la presencia de monocitos. Para probar esta hipótesis, las CMSP depletadas de monocitos fueron estimuladas con IL-2 y cultivadas en presencia de  $10^3$  o  $10^4$  monocitos y SLPI. En la Figura 22 se observa que el agregado de  $10^4$  monocitos, restableció el efecto inhibitorio del SLPI sobre la proliferación celular. Notablemente, la cantidad de monocitos en el cultivo fue crucial ya que la presencia de  $10^3$  monocitos no pudo restablecer el efecto del SLPI.

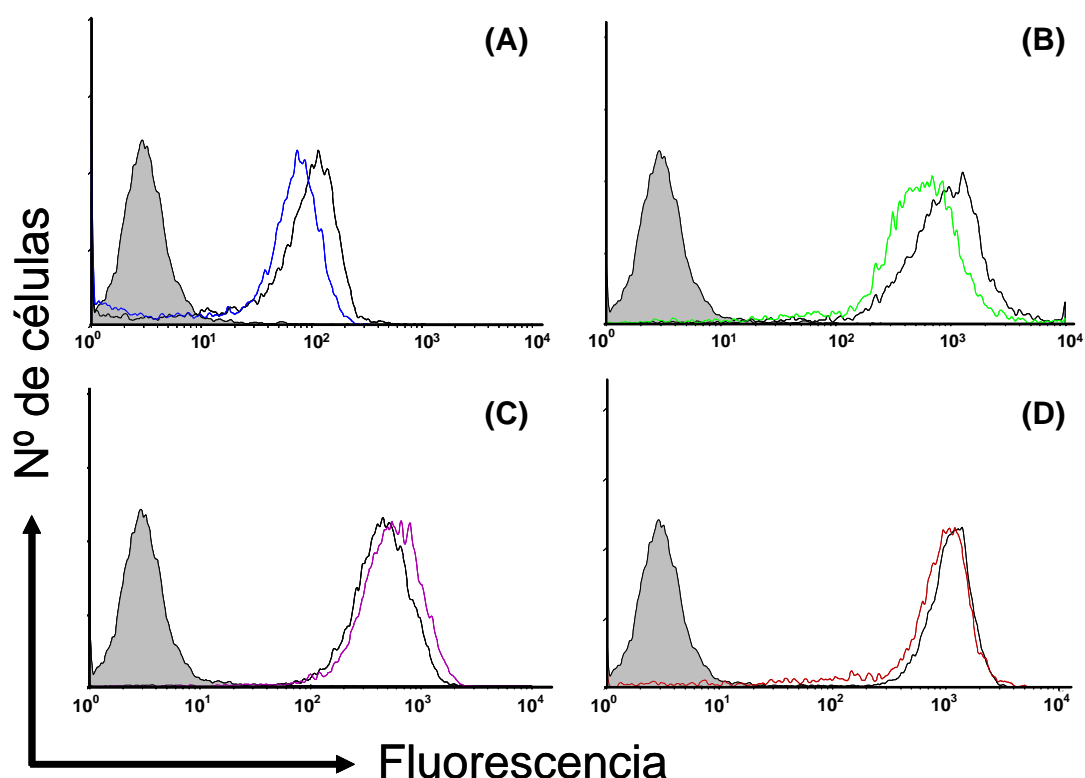


**Figure 22. Los monocitos son necesarios para inhibir la proliferación.** CMSP  $10^5$  depletadas de células CD14<sup>+</sup> fueron cultivadas por 5 días en presencia de IL-2 (8ng/ml). Los cultivos fueron suplementados con o sin SLPI (4 $\mu$ g/ml) y  $10^3$  o  $10^4$  células CD14<sup>+</sup>. La proliferación se cuantificó como se indica en la figura 11. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ESM para 3 experimentos independientes. \*p<0.05, \*\*p<0.01 ANOVA pos hoc Dunnett Comparaciones multiples.

Siendo el monocito el blanco de la acción del SLPI, el siguiente paso fue analizar los efectos del SLPI sobre los monocitos. En primer lugar se estudió la capacidad del SLPI de modificar la expresión de moléculas de superficie (CD54, CD14, MHC I, MHC II, CD86 y CD18) sobre poblaciones de monocitos puros obtenidos a través de gradientes de Percoll. Estas determinaciones se hicieron por inmunomarcación directa cuantificando la fluorescencia por citometría de flujo. Para estos experimentos, los monocitos fueron tratados con SLPI durante 18 horas como fue indicado de forma detallada en Materiales y



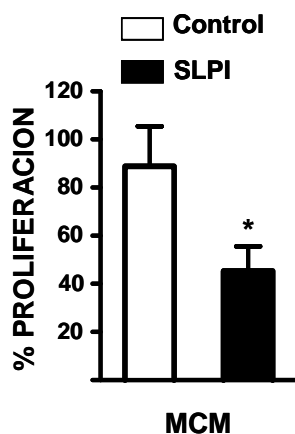
Métodos. Analizadas las inmunomarcaciones se pudo observar que el SLPI disminuyó levemente la expresión de CD14 (Figura 23 A) y MHC II (Figura 23 B); en tanto que no se observaron diferencias en la expresión de CD54 y MHC I (Figura 23 C y D respectivamente). Las moléculas de superficie CD18 y CD86 tampoco presentaron diferencias en su expresión (datos no mostrados).



**Figura 23. SLPI disminuye CD14 y MHC II en monocitos.** Expresión de CD14 (A), MHC de clase II (B), MHC de clase I (C) y CD54 (D) en monocitos tratados o no con SLPI. Monocitos sin tratar (histogramas negros) o tratados con SLPI (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.

Debido a que en las citometrías no se encontraron grandes cambios en las moléculas de superficie que puedan justificar el efecto inhibitorio de la proliferación, el siguiente paso

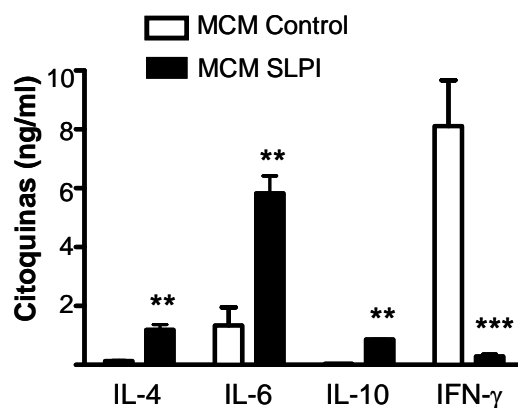
fue evaluar la presencia de factores solubles producidos por los monocitos tratados con SLPI. En este caso los monocitos fueron aislados por selección positiva para la molécula CD14 y los medios condicionados de monocitos (MCM) se obtuvieron tal como se describe en la sección Materiales y Métodos. Una vez obtenidos los MCM, estos fueron analizados en su capacidad para modificar la proliferación de CMSP depletadas de monocitos en respuesta a IL-2. La figura 24 muestra que únicamente los MCM derivados de monocitos pre-tratados con SLPI tenían la capacidad de inhibir la proliferación celular inducida por IL-2. Es importante remarcar que los MCM derivados de monocitos pre-tratados con SLPI carecen de SLPI, ya que los medios se obtienen durante 24 horas posteriores al tratamiento con el SLPI y luego de lavar exhaustivamente a las células.



**Figure 24. Los MCM generados con SLPI inhiben la proliferación.** CMSP depletados de células CD14<sup>+</sup> fueron cultivadas por 5 días estimuladas con IL-2 (8 ng/ml) y tratadas con MCM pretratados o no con SLPI. La proliferación se cuantificó como se indica en la figura 1. Los datos se expresan como medias  $\pm$  ESM del porcentaje de proliferación relativo al control de proliferación para 6 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \* $p < 0.05$  ANOVA pos hoc Dunnett Comparaciones multiples.

Analizados también la expresión de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de estos cultivos al final del período de incubación (5to día) se comprobó que el MCM pretratado con SLPI disminuyó dramáticamente los niveles de IFN- $\gamma$  (Figura 25) al tiempo que aumentó la expresión de IL-4, IL-6 e IL-10. Estos resultados

son muy similares a los de la Figura 18 donde se analizaban las citoquinas en los sobrenadantes de los cultivo de CMSP en presencia de IL-2+SLPI. De esta manera, el SLPI estaría actuando a través de los monocitos disminuyendo la proliferación linfocitaria al inhibir respuestas de tipo Th1.

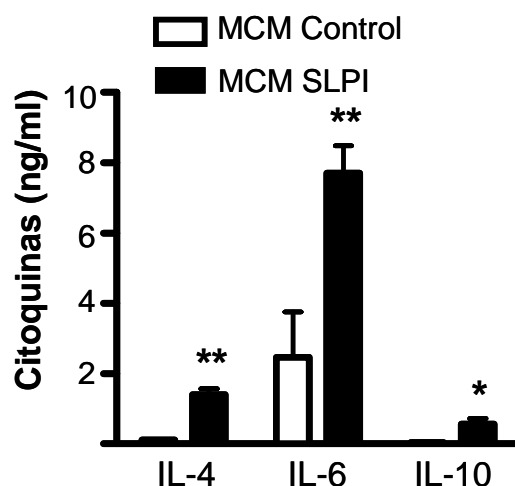


**Figura 25. SLPI modifica el perfil de secreción de citoquinas.** Los MCM pretratados con SLPI inducen la expresión de IL-4, IL-6, IL-10 e inhiben IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo de CMSP depletadas de monocitos y tratadas con IL-2. Las citoquinas se cuantificaron con el kit BD<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array y los resultados fueron analizados con BD<sup>TM</sup> CBA Software. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de tres experimentos independientes. . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . \*\*\* $p < 0.001$  ANOVA pos hoc Dunnett Comparaciones múltiples.

## 2.2. Efecto sobre la secreción de citoquinas

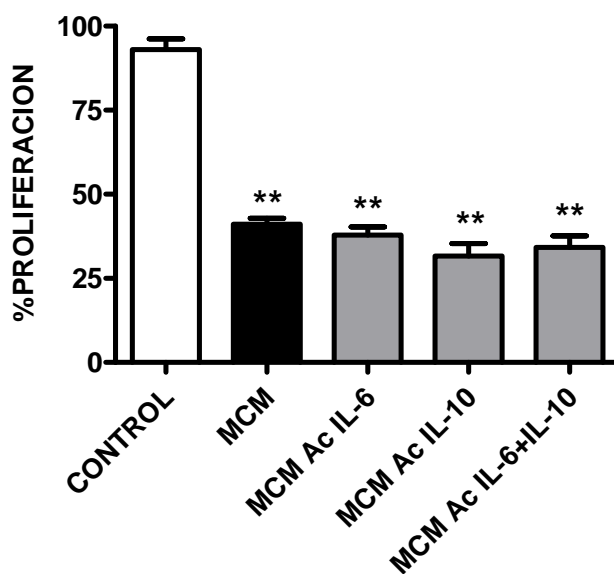
Los resultados hasta ahora descritos demuestran que el SLPI modifica la proliferación linfocitaria y el patrón de citoquinas a través de al menos un factor soluble, probablemente una citoquina, liberada por los monocitos. Por lo tanto, se analizó los niveles de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de los MCM que presentaban actividad inhibitoria sobre la proliferación. Los niveles basales de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 en los MCM se encontraron por debajo de los límites de detección de la técnica utilizada y el SLPI no modificó dichos niveles. Sin embargo, en la Figura 26 se observa que el SLPI aumentó la secreción de IL-4, IL-6 e IL-10 sugiriendo que los monocitos tratados con SLPI favorecen la secreción de citoquinas anti-inflamatorias o de un perfil Th2. Estos resultados muestran

que el SLPI actuando a través de los monocitos, secretan citoquinas del perfil Th2 que podrían disminuir la proliferación linfocitaria y los patrones de tipo Th1.



**Figura 26. SLPI modifica el perfil de secreción de citoquinas en MCM.** Expresión de citoquinas IL-4, IL-6 e IL-10 en MCM pretratados o no tratados con SLPI (4 $\mu$ g/ml). Las citoquinas se cuantificaron con el kit BD<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array y los resultados fueron analizados con BD<sup>TM</sup> CBA Software. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de tres experimentos independientes. . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . \*\*\* $p < 0.001$  ANOVA pos hoc Dunnett Comparaciones multiples.

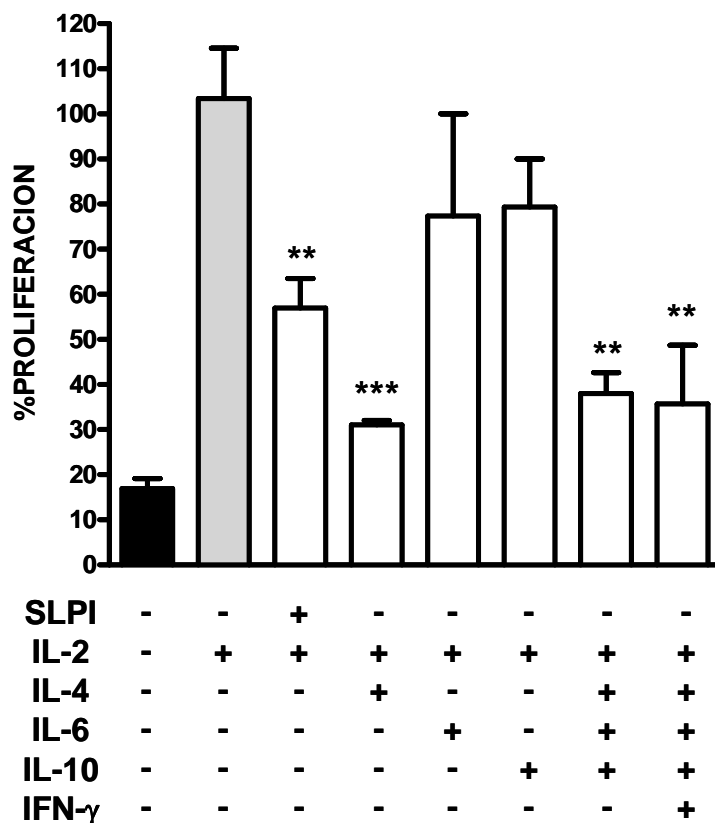
Para corroborar efectivamente que el efecto inhibitorio de los MCM sobre la proliferación se debían a las citoquinas presentes en el mismo e inducidas por el SLPI, se realizaron experimentos de bloqueo de las citoquinas IL-10 e IL-6. En la figura 27 se observa que los anticuerpos bloqueantes para IL-10 e IL-6 no lograron revertir el efecto inhibitorio de los MCM pre-tratados con SLPI sobre la proliferación linfocitaria. Estos resultados sugieren que ninguna de las 2 citoquinas examinadas (IL-10 e IL-6) presentes en los MCM son las responsables de generar la inhibición linfocitaria.



**Figura 27. IL-10 e IL-6 no son responsables de inhibir la proliferación.**  $10^5$  CMSP depletados de monocitos fueron cultivados por 5 días en presencia de MCM pretratados con SLPI. Los Ac bloqueantes para IL-6 (1  $\mu$ g/ml) e IL-10 (0.5  $\mu$ g/ml) fueron agregados a los MCM 30 minutos antes del ensayo y permanecieron en los cultivos durante los 5 días. La proliferación se cuantificó como se indica en la figura 11. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ESM para tres experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$  ANOVA pos hoc Dunnett Comparaciones múltiples.

El siguiente paso fue examinar si el agregado exógeno de estas citoquinas (IL-4, IL-6 e IL-10) presentes en los hallados en los MCM pre-tratados con SLPI, podrían simular el efecto inhibitorio del SLPI. Para ello, CMSP fueron tratadas con IL-2 en presencia de las citoquinas recombinantes IL-10, IL-6, IL-4 e IFN- $\gamma$ . Vale la pena aclarar que las concentraciones utilizadas para estos ensayos fueron las mismas que las halladas en los MCM pre-tratados con SLPI. En la figura 28 se observa que la inhibición de la proliferación linfocitaria se produjo cuando las células fueron incubadas únicamente con IL-4. Este efecto se observó aún en presencia de las demás citoquinas. A partir de estos últimos resultados es posible hipotetizar que el SLPI actúa sobre los monocitos al inducir

un aumento en la producción de IL-4 y esta molécula podría ser la responsable de producir la inhibición de la proliferación linfocitaria observada.

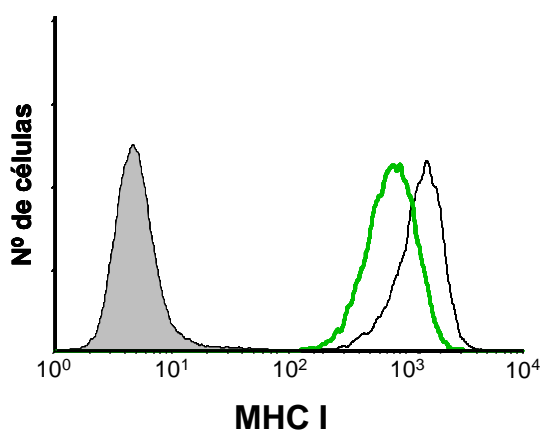


**Figura 28. IL-4 inhibe la proliferación linfocitaria.** CMSP ( $10^5$  /pocillos) se cultivaron por 5 días en presencia de IL-2 (8 ng/ml). Los cultivos fueron tratados con o sin IL-4 (2ng/ml); IL-6(10 ng/ml); IL-10 (0.7 ng/ml); IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) o SLPI (4  $\mu$ g/ml). La proliferación se cuantificó por la incorporación de  $[3H]TdR$  durante las últimas 18 hs. del cultivo. Los datos se expresan como medias  $\pm$  ESM de dos experimentos independientes. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 ANOVA pos hoc Dunnett para comparaciones múltiples.

### 2.3. Actividad del SLPI sobre Células dendríticas (CDs)

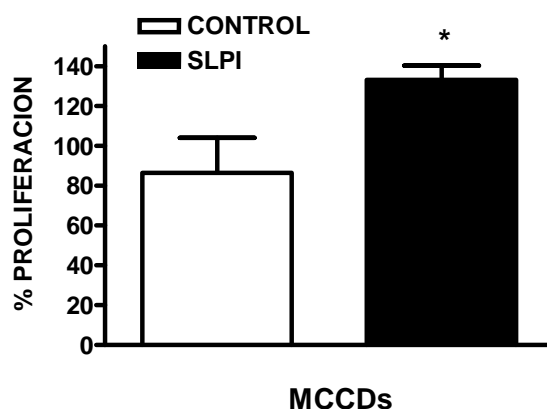
Además de los monocitos, otro de los posibles blancos del SLPI podrían ser las células dendríticas (CDs). Por lo tanto, en esta sección se estudió el efecto del SLPI sobre CDs derivadas de monocitos. En primer lugar se analizó si el SLPI podría modificar el fenotipo de las CDs, en particular la expresión de moléculas de MHC de clase I y II. Una vez

generadas las CDs como se describe en Materiales y Métodos, éstas fueron expuestas a SLPI durante 18 horas. En la Figura 29 se observa que el tratamiento de las CDs inmaduras con SLPI (18 hs, 37°C), disminuyó la expresión de MHC de clase I, pero no modificó la expresión de MHC II. Estos resultados son opuestos a los hallados en monocitos, por lo tanto se especuló que la capacidad de estas CDs o sus medios condicionados (MCCDs) pre-tratadas con SLPI podrían ser diferentes a los MCM.



**Figura 29. SLPI disminuye MHC I en células dendríticas.** CDs sin tratar (histograma negro) o tratadas con SLPI (4 µg/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.

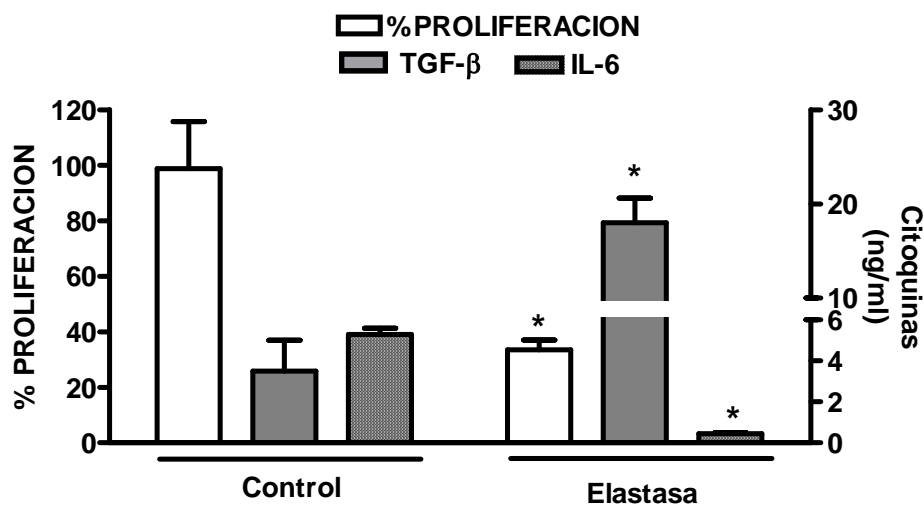
De esta manera, una vez generados los MCCDs pretratados con SLPI se analizó la capacidad de los mismos para modificar la proliferación CMSP depletadas de monocitos en respuesta a IL-2. La figura 30 muestra que los MCCDs tratados con SLPI no pudieron disminuir la proliferación linfocitaria, por el contrario, aumentaron los niveles proliferación. Con estos experimentos queda demostrado que el SLPI puede actuar sobre monocitos y sobre CDs, pero los resultados podrían ser diametralmente opuesto en cuanto a la capacidad de modular la proliferación linfocitaria y el perfil de citoquinas.



**Figura 30. Los MCCDs tratados con SLPI aumentan la proliferación linfocitaria.** CMSP depletados de células CD14<sup>+</sup> fueron estimuladas con IL-2 (8 ng/ml) y tratadas con MCCDs pretratados con SLPI. La proliferación se cuantificó como se indica en la figura 11. Los datos se expresan como medias  $\pm$  ESM del porcentaje de proliferación relativo al control de proliferación para dos experimentos independientes \* $p < 0.05$ , ANOVA pos hoc Dunnett Comparaciones multiples.

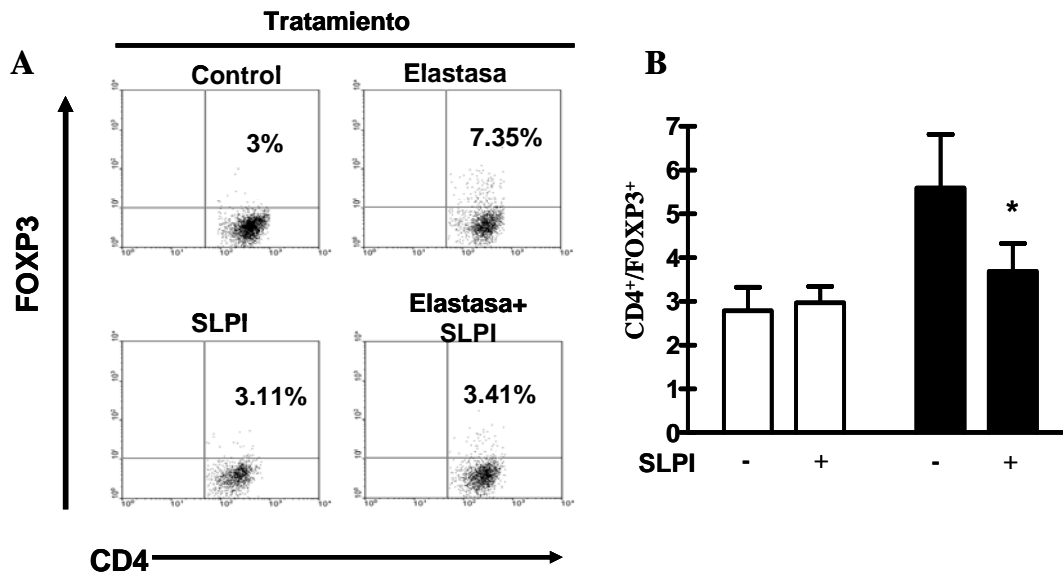
Siendo las CDs, una de las principales células inductoras de diferentes tipos de respuesta inmune, se hipotetizó que el tratamiento de las CDs con SLPI podría estar modificando o modulando el perfil de respuesta inmune. Sin embargo, la presencia del SLPI está ligada a la presencia de la elastasa neutrofílica. De hecho, la elastasa induce la liberación de SLPI y esta a su vez inhibe la actividad de la elastasa. Además, en nuestro laboratorio trabajos previos demostraron que la elastasa neutrofílica humana, principal sustrato del SLPI, tiene la capacidad de inhibir la actividad linfoproliferativa de CDs en cultivos mixtos alogénicos, aumentando simultáneamente los niveles de TGF- $\beta$  y disminuyendo los niveles de IL-6 (Figura 31).



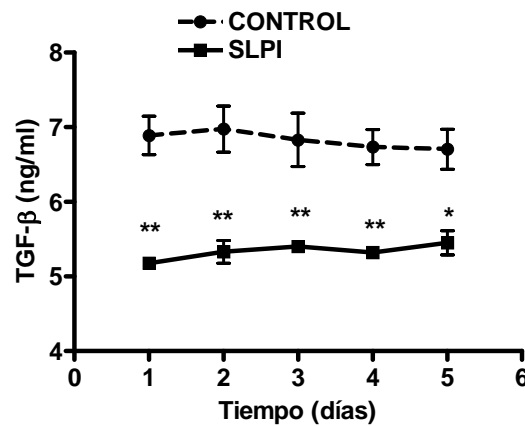


**Figura 31. Efecto de la Elastasa sobre las CDs.** CDs fueron tratadas por tres horas con Elastasa, luego fueron lavadas e incubadas por 48 hs en medio completo. Finalmente el sobrenadante se recuperó y se cuantificó TGF-β1 por ELISA e IL-6 por el kit BD cytometric bead array. Para la proliferación las CDs fueron cocultivadas con CMSP por 5 días y se cuantificó la proliferación como se indica en la figura 11. Los datos representan las medias  $\pm$  ESM de tres experimentos independientes \* $p < 0.05$ , ANOVA pos hoc Dunnett Comparaciones multiples.

Dada que la producción de TGF-β es característica de los linfocitos T reguladores y que la IL-6 inhibe la expresión de T reguladoras, se hipotetizó que las CDs tratadas con elastasa estarían disminuyendo la proliferación linfocitaria al generar un aumento en la población de células T regulatorias; en tanto que el SLPI inhibiría la generación de T reguladoras al bloquear la actividad de la elastasa y aumentar de manera exagerada IL-6. Para demostrar esta hipótesis las CDs fueron tratadas con elastasa, SLPI o ambos durante 3 horas. Luego de una serie de lavados, las CDs se las co-cultivaron con CMSP alogénicas y, al 5to día, se cuantificó la población que expresaba el marcador FOXP3, característico de linfocitos T reguladores. La Figura 32 muestra que las CDs pretratadas con elastasa aumentan los niveles de células CD4<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> mientras que el tratamiento con SLPI revierte el aumento observado. Simultáneamente a esta observación se pudo determinar que el SLPI induce una disminución en los niveles de TGF-β en CMSP (Figura 33). Por lo tanto es posible especular que el SLPI disminuye los niveles de T reguladoras inducidos por la elastasa neutrofílica modificando los niveles de TGF-β.

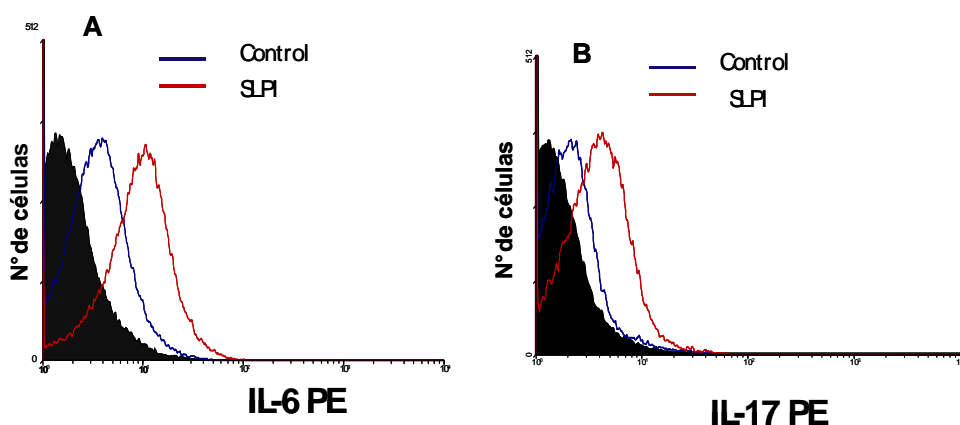


**Figura 32. SLPI inhibe la inducción de Treg.** CDs fueron tratadas con elastasa (75  $\mu$ M) en presencia o no de SLPI (4  $\mu$ g/ml) por tres horas. Luego las CDs fueron lavadas y sembradas en cultivo con  $10^5$  CMSP por 5 días. Finalmente las células fueron marcadas con CD4-PE-Cy5 y FOXP3-PE como se describe en materiales y métodos. (A) Corresponde a un experimento representativo. (B) Media  $\pm$  ESM de cinco experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , ANOVA pos hoc Dunnett Comparaciones múltiples.



**Figura 33. SLPI disminuye los niveles de TGF- $\beta$ .** Se cuantificó TGF- $\beta$  en sobrenadantes de cultivo de CMSP estimulados con SLPI (4  $\mu$ g/ml) a lo largo de cinco días. Mediante un sándwich Elisa se determinó los niveles de TGF- $\beta$ . Media  $\pm$  ESM de 2 experimentos independientes. Los datos fueron analizados utilizando el test de Student-Newman-Kule; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Existe un balance entre los distintos tipos de respuesta inmune. De tal manera que la ausencia de regulación por parte de las T reguladoras podría llevar a la inducción de enfermedades autoinmunes. Es por eso que la siguiente pregunta fue si un exceso de SLPI sobre las CDs podría estar induciendo un patrón de citoquinas compatibles con enfermedades autoinmunes al disminuir las T reguladoras y aumentar los linfocitos Th17. Para corroborar esta hipótesis se diseñó el siguiente experimento. CDs fueron pre-tratadas con SLPI e incubadas con CMSP alogénicas y OKT3. De esta manera, se genera una respuesta proliferativa elevada. Al 5to día las células fueron cosechadas y se cuantificaron los niveles linfocitarios intracitoplasmáticos de IL-6 e IL-17 por citometría de flujo en las células CD3<sup>+</sup>. Los resultados de la Figura 34 muestran que las CDs pretratadas con SLPI aumentan los niveles intracitoplasmáticos de IL-6 y de IL-17 en los linfocitos. Estos resultados indican que el SLPI actuando sobre las CDs podría estar favoreciendo el perfil Th17.



**Figura 34. SLPI aumenta los niveles de IL-6 e IL-17.** CMSP estimuladas con OKT3 e incubadas con CDs alogénicas pretratadas con SLPI (4  $\mu$ g/ml) fueron marcadas con un anticuerpo monoclonal CD3 APC (eBioscience), IL-6 PE (A) (IQ) y anti-IL-17(B) (eBioscience). Se muestran los resultados obtenidos en un experimento representativo de dos experimentos independientes. El control de isotipo se muestra en negro y fue similar para ambos grupos.

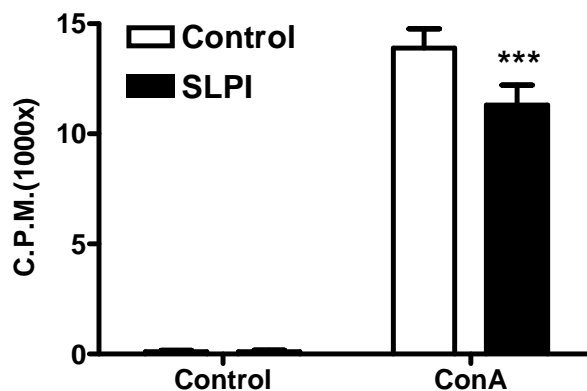
En conjunto, hasta aquí estos resultados sugieren que el SLPI estaría inhibiendo la producción de linfocitos T reguladores, el perfil Th1 e induciendo un perfil Th17, sin modificar el perfil Th2.

### **3. EFECTO DEL SLPI *IN VIVO***

La respuesta inmune adaptativa es un componente crítico de la defensa del organismo frente a infecciones para mantener la salud. Desafortunadamente algunas veces la respuesta inmune adaptativa se activa ante antígenos no asociados a agentes infecciosos y esto puede generar patologías. Una situación en la que esto ocurre es en las respuestas conocidas como reacciones de hipersensibilidad retardada. Las reacciones de hipersensibilidad retardada son trastornos causados por una disfunción en la regulación del sistema inmune. Son respuestas inmunes carentes de una regulación adecuada, dirigidas contra antígenos propios (enfermedades autoinmunes) o foráneos. Por lo tanto frente a los resultados observados para el SLPI en cuanto a su capacidad de modificar el patrón de secreción de citoquinas y los distintos factores de transcripción de los perfiles T. Se decidió evaluar la capacidad inmunomodulador del SLPI en distintos modelos *in vivo* de hipersensibilidad retardada.

#### **3.1. Efecto del SLPI en la Orquitis Autoinmune Experimental**

A partir de los resultados obtenidos *in vitro* sobre el efecto del SLPI en la proliferación y diferenciación de los perfiles T en humanos se decidió evaluar la relevancia de estos resultados en un modelo de Orquitis Autoinmune Experimental (EAO) en ratas. Sin embargo, previo a comenzar a trabajar con este modelo, y dado que se disponía de SLPI humano y no murino, decidimos examinar la capacidad del SLPI humano de inhibir la proliferación de esplenocitos murinos *in vitro*. Para ello esplenocitos de ratas fueron incubados *in vitro* con el mitógeno ConA en presencia o ausencia de SLPI. Al 5to día, se cuantificó la proliferación como se describió en la sección Materiales y Métodos. En la Figura 35 se observa que el estímulo con ConA aumentó la proliferación celular y que la presencia de SLPI redujo significativamente dicha proliferación. Este resultado permitió establecer que el SLPI humano tenía efectos sobre la proliferación de los linfocitos murinos.

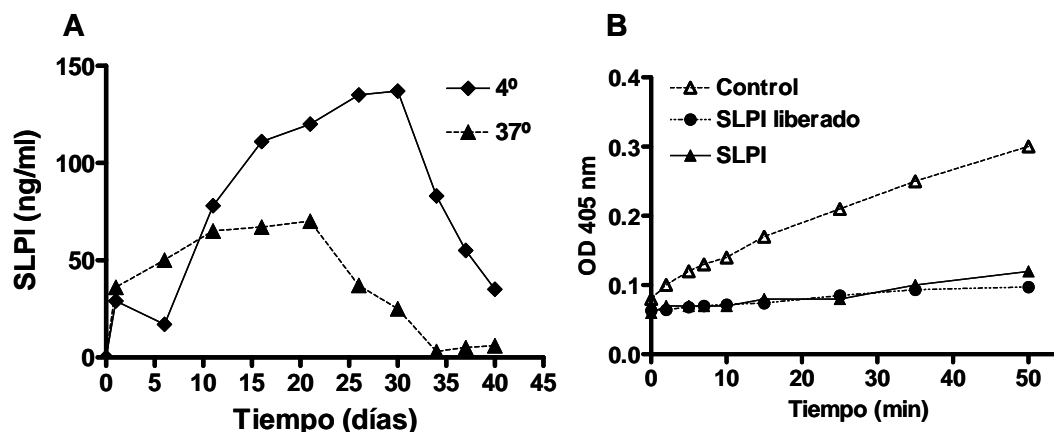


**Figura 35. SLPI inhibe la proliferación de esplenocitos de ratas.**  $5 \times 10^5$  esplenocitos fueron incubados en placas de 24 pocillos con ConA (3  $\mu\text{g/pocillo}$ ) en presencia o no de SLPI (2.5  $\mu\text{g/pocillo}$ ). La incorporación de timidina se midió al 5to día por un pulso de 18 hs con [3H]-thymidine 1  $\mu\text{Ci/pocillo}$ . Los datos se expresan como medias  $\pm$  DS de triplicados de un experimento representativo. \*\*\* $p < 0.001$  ANOVA pos hoc Dunnett Comparaciones multiples

### 3.2. Sistema de entrapamiento de SLPI

El modelo de OAE requiere periodos prolongados de tiempo para desarrollarse y para que se pongan en evidencia las lesiones. Por otro lado se encuentra descrito en bibliografía que la vida media del SLPI *in vivo* es muy corta ya que rápidamente es degradado por proteasas. Por lo tanto se decidió generar un sistema para incrementar la vida media del SLPI y de esta manera poder determinar el efecto inmunomodulador en el modelo EAO en las ratas. Para ello, el SLPI fue entrapado en micropartículas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) a través de una emulsión agua-en-aceite-en-agua ( $A_1/O/A_2$ ) tal como se describe en Materiales y Métodos. El PCL es un polímero biodegradable que a medida que se degrada permite la liberación lenta de la sustancia entrapada. El sistema de micropartículas de PCL demostró en ensayos *in vitro* una liberación sostenida del SLPI al menos por un período de 30 días (Figura 36 A). Estos ensayos se hicieron en dos condiciones: a 37°C y a 4°C. En ambos casos se pudo cuantificar SLPI liberado al medio a partir de las primeras 24 hs y se sostuvo en el tiempo hasta el día 21 y 30 para las condiciones de 37°C y 4°C, respectivamente. También se evaluó la actividad antiproteasa de este SLPI liberado al medio. Para ello se utilizó el SLPI liberado al medio del día 21 en la condición de 4°C y se

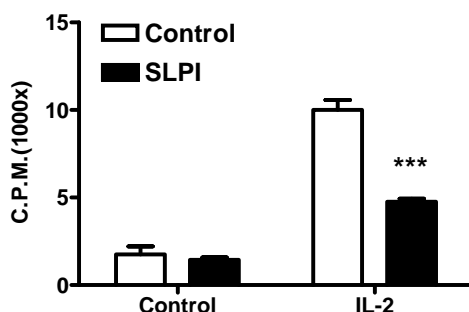
utilizó como control positivo de inhibición de tripsina un SLPI no entrampado. Los resultados de la figura 36B muestran que el SLPI liberado al medio tiene la misma capacidad de inhibir la actividad enzimática de la tripsina que un SLPI no entrampado.



**Figure 36. Las micropartículas liberan SLPI de manera sostenida.** (A) 30 miligramos de micropartículas secas fueron resuspendidas en PBS y los tubos fueron incubados a 4° y 37°. Las muestras se tomaron con reposición del volumen en intervalos de tiempos especificados por un total de 40 días. Para evaluar la cantidad de SLPI liberado se realizó un ensayo de ELISA sandwich. (B) El SLPI liberado por las micropartículas inhibe la actividad proteasa de tripsina. La muestra de SLPI liberado y una muestra de concentración conocida de SLPI usada como control positivo fueron incubadas con tripsina y el sustrato colorimétrico N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe  $\alpha$ -nitroanilida. La absorbancia se midió a 405nm en un lector de microplacas. Los datos expresan las medias  $\pm$  SD de triplicados para un experimento representativo.

Otro punto que se tuvo que evaluar fue determinar si el SLPI liberado mantendría la actividad biológica ya descrita. Por lo tanto las micropartículas con SLPI se colocaron en la parte superior de una cámara separada de otra cámara inferior por un filtro de policarbonato de 0.4  $\mu$ m de diámetros, donde se colocaron las CMSP humanas estimuladas con IL-2. De esta manera, el filtro dejaría pasar la proteína liberada y si mantenía la actividad biológica, el SLPI liberado debería ser capaz de inhibir la proliferación. En la Figura 37 se observa que el SLPI liberado por las micropartículas presentes en la cámara superior, tuvieron la capacidad de inhibir significativamente la proliferación de linfocitos presentes en la cámara inferior. Además se pudo cuantificar por ELISA el SLPI presente en

los medios de cultivo. En las células tratadas con micropartículas los niveles de SLPI fueron de  $70 \pm 5$  ng/ml mientras que en los controles no fue posible detectar SLPI. Esta serie de resultados muestran que el sistema de entrapamiento diseñado funciona para generar una liberación continua y sostenida de SLPI biológicamente activo. De esta manera fue posible especular que las micropartículas con SLPI podrían ser un sistema efectivo para modular la respuesta inmune en un modelo murino de autoinmunidad de larga duración.

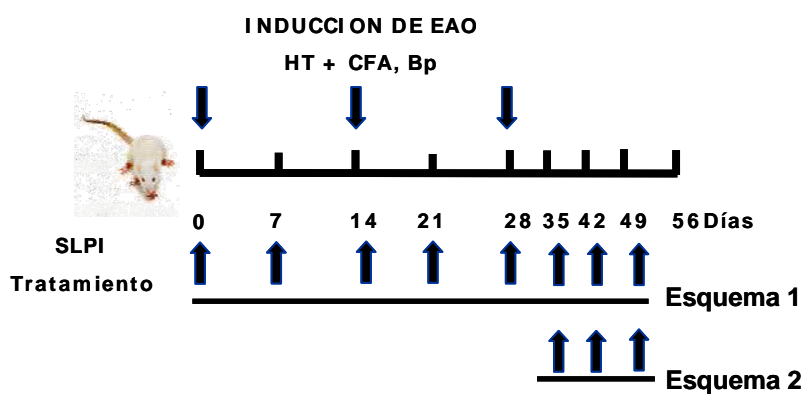


**Figura 37. SLPI liberado inhibe la proliferación linfocitaria.** CMSP fueron sembradas en la cámara inferior de una placa de 24 pocillos estimuladas con IL-2 (8 ng/ml) en presencia de 10 mg de microesferas de SLPI o microesferas control presentes en la cámara superior. Ambas cámaras se encontraban separadas por un filtro con poros de  $0.4 \mu\text{m}$ . La incorporación de timidina fue evaluada a los 5 días con un pulso de 18 hs de  $[3\text{H}]$ -thymidine. Los datos presentados son la media  $\pm$  ESM de los triplicados de cultivo de 2 experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$  ANOVA pos hoc Dunnett para comparaciones múltiples.

### 3.3. SLPI disminuye las lesiones en EAO

Una vez establecido y caracterizado el sistema de liberación de SLPI *in vitro*, se procedió a estudiar el efecto inmunomodulador del SLPI en el modelo de EAO en ratas. Este modelo fue desarrollado inmunizando ratas machos adultas con tres dosis de antígenos testiculares (TH) con adjuvante completo de Freudnd's y *Bordetella pertussis* como coadjuvante, tal

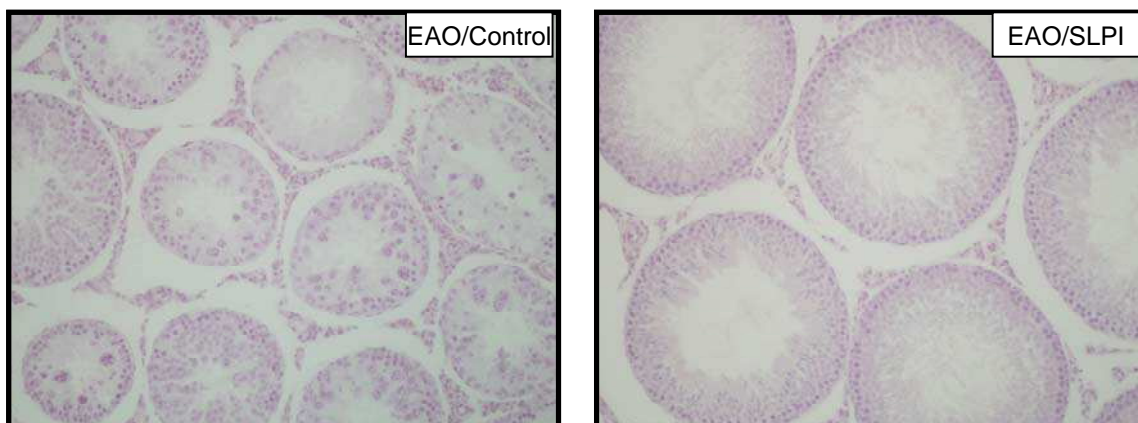
como se detalla en Materiales y Métodos. Los animales recibieron como tratamiento 100 mg de micropartículas vacías o 100 mg de micropartículas cargadas con SLPI. La administración de las micropartículas se realizó de forma subcutánea una vez por semana, en dos esquemas (figura 38). El primer esquema consistió en administrar las micropartículas desde el día 0 (esquema 1), es decir en la fase de inducción de la EAO. En el segundo esquema se administró las micropartículas a partir del día 30 (esquema 2), es decir una vez finalizado la fase de inducción.



**Figura 38. Inducción de EAO.** Las animales fueron inmunizados con 3 dosis, administradas cada 14 días, de homogenato testicular (HT) (0.4 ml) emulsionados con Adjuvante Completo de Freund's (CFA) (0.4 ml) y *Bordetella pertussis* (Bp) como co-adjuvante. Para el esquema 1, se administro desde el día 0 y cada semana 100 mg de micropartículas con SLPI o micropartículas control de forma subcutánea. Para el esquema 2 se administraron las micropartículas pero solamente a partir del día 30 del protocolo. Los animales fueron sacrificados y los testículos procesados al día 56.

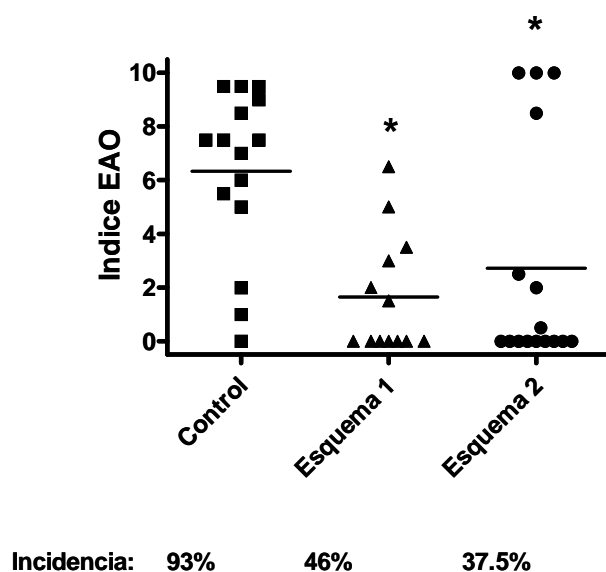
Se evaluó la presencia de lesiones focales en los cortes histológicos de los testículos de los animales sacrificados a los 56 días. El cuadro de orquitis fue definido como presencia de al menos un foco de lesión en los cortes analizados al microscopio. La Figura 39 muestra un corte representativo de la histopatología encontrada en los animales control y en los animales tratados con SLPI.





**Figura 39. Histopatología testicular.** Secciones de testículos de animales con EAO control y SLPI (esquema 1) fueron sacrificados al día 56 luego de la primera inmunización. El grupo control presenta daño multifocal caracterizado por el infiltrado de células inflamatorias en el intersticio y presenta diferentes grados de desprendimiento de las células germinales en los túbulos seminíferos. En contraste, los animales del grupo SLPI presentan poco o ningún infiltrado y un epitelio normal de los túbulos seminíferos. Hematoxilina-Eosina. Aumento X 100.

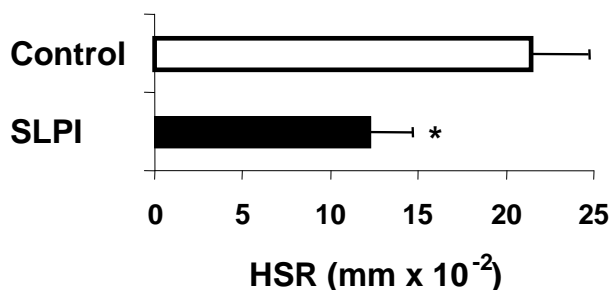
En la figura 40, se observa que tanto para el esquema 1 como para el esquema 2 las micropartículas de SLPI lograron disminuir de manera significativa la incidencia de la enfermedad. Además de una menor incidencia, el tratamiento con micropartículas SLPI disminuyó el grado de severidad de las lesiones cuantificadas a través de un índice que considera el número de lesiones por corte (media Índice EAO: control =  $6.33 \pm 0.81$ ; Esquema 1 =  $1.65 \pm 0.61$ ; Esquema 2  $2.72 \pm 1.05$ ).



**Figura 40. Las micropartículas con SLPI inhiben las lesiones en EAO.** Al día 56 del protocolo los animales fueron sacrificados y los testículos fueron fijados con solución de Bouin's y embebidos en parafina para determinar la histopatología. El índice EAO toma en consideración el porcentaje de daño en los túbulos seminíferos (V), el grado de desprendimiento de las células germinales (T) y la relación peso del testículo/peso del animal (P). Por lo tanto el índice =V+T+P. Cada símbolo representa un animal ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney test).

### 3.4. SLPI disminuye la HSR inducida por Ag testicular

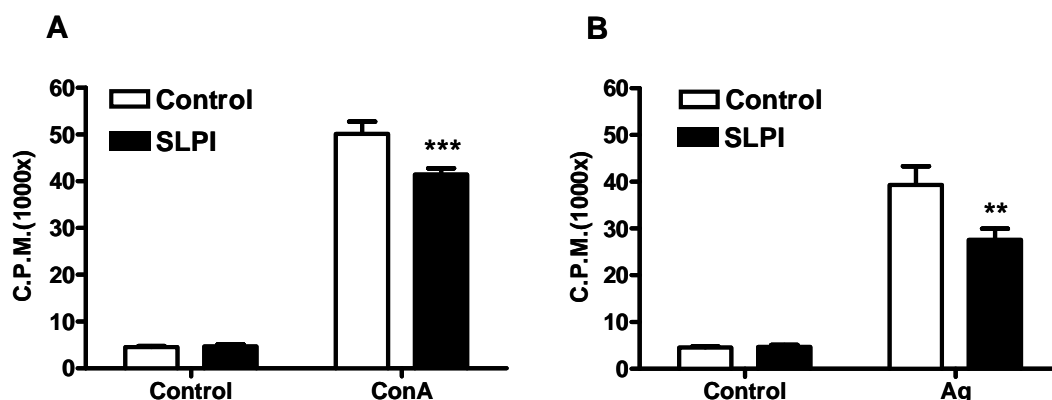
Simultáneamente a los experimentos de la sección anterior, y previo al sacrificio, la sensibilidad de los animales frente al Ag testicular fue evaluada como una manera de evaluar la hipersensibilidad retardada (HSR). Para ello, dos días previos al sacrificio los animales fueron inoculados de forma subcutánea en la pata con homogenato testicular (TH) y a las 48 hs se evaluó el grado de inflamación con un microcalibre. En la Figura 41 se puede observar que los animales tratados con micropartículas con SLPI mostraron una respuesta significativamente menor frente al Ag.



**Figura 41. Las micropartículas con SLPI disminuyen la HSR.** Se cuantificó la HSR frente al HT en animales con EAO tratadas con micropartículas control o con micropartículas SLPI. Dos días previos al sacrificio (día 54) los animales fueron inyectados de forma subcutánea en la pata derecha con 20  $\mu$ l de HT. En la pata izquierda recibieron solución salina. La inflamación se evaluó con un microcalibre a las 48 hs. Los resultados representan la media de la diferencia en grosor entre la pata que recibió el HT y la pata que recibió solución salina  $\pm$  ESM para cada grupo. \* $p < 0.05$  (Mann-Whitney test). N = 16 ratas/grupo.

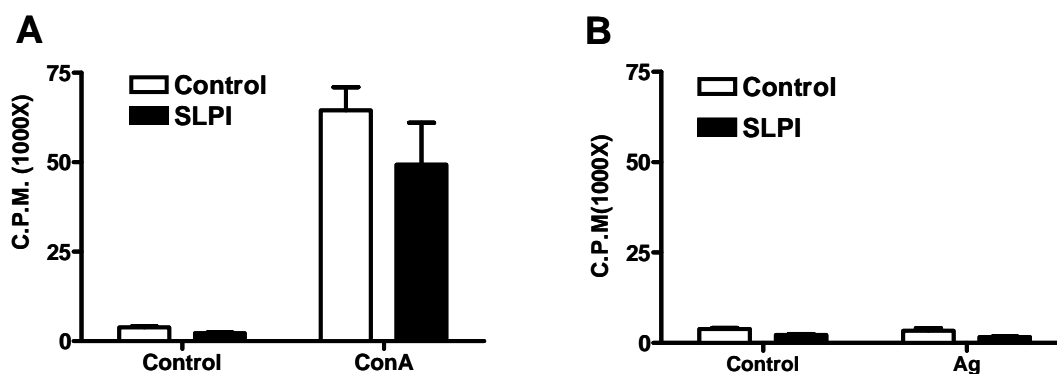
### 3.5. SLPI disminuye la respuesta celular

Por último, también se evaluó la proliferación linfocitaria *in vitro* de las células obtenidas de los ganglios linfáticos drenantes de los testículos y del bazo en los animales con EOA. En el día del sacrificio (día 56) se obtuvieron los ganglios periféricos de la zona drenante de los testículos y del sitio de inmunización del Ag testicular (ganglios poplíteos, ganglios inguinales, ganglios iliacos y ganglios renales) y el bazo de cada animal. Una vez disgregados los órganos y obtenidas las células, éstas fueron estimuladas con ConA o con el HT. En la figura 42 se observa que ambos estímulos, Con A y HT, inducen una mayor proliferación celular. Este incremento fue menor si las células provenían de los ganglios linfáticos regionales de los animales tratados con micropartículas con SLPI.



**Figura 42. Micropartículas con SLPI inhiben la respuesta inmune celular.**  $5 \times 10^5$  linfocitos por pocillo, obtenidos de los ganglios regionales de ratas con EAO tratadas con micropartículas control o micropartículas con SLPI, se incubaron en microplacas estimuladas con Con A  $15 \mu\text{g/ml}$  (A) o Ag testicular  $5 \mu\text{g/ml}$  (B). Se cuantificó la proliferación celular por la incorporación de timidina a los 3 días con un pulso de 18 hs. Los datos presentados son la media  $\pm$  ESM de los triplicados de cultivo de tres experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$  ANOVA pos hoc Dunnett para comparaciones multiples.

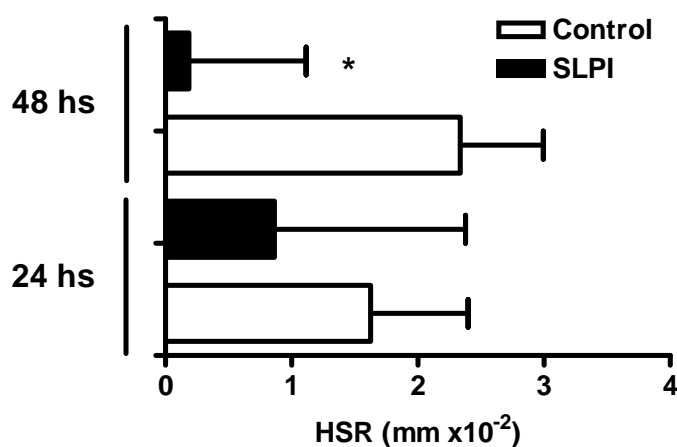
Cuando se analizó la proliferación de los esplenocitos de los animales inducidos a presentar EAO, se pudo observar un aumento de la proliferación con ConA, pero no se observó cambios significativos frente al agregado de HT. Tampoco se pudo apreciar diferencias significativas en la proliferación de esplenocitos provenientes de los animales que habían recibido micropartículas con SLPI o control (Figura 43). Por lo tanto estos resultados sugieren que la liberación sostenida de SLPI disminuye la respuesta inmune celular en los ganglios regionales próximos al foco inflamatorio, pero no modifica la respuesta celular a nivel central. Este podría ser el mecanismo por el cual el SLPI disminuye el grado de lesión en el modelo experimental de orquitis autoinmune al controlar la respuesta celular local.



**Figura 43. SLPI no modifica la respuesta de los esplenocitos.** Se colocaron  $5 \times 10^5$  esplenocitos por pocillo, provenientes de ratas inducidas a desarrollar EAO, tratadas con micropartículas control o micropartículas con SLPI. Los esplenocitos fueron incubados con Con A  $15 \mu\text{g/ml}$  (A) o Ag testicular  $5 \mu\text{g/ml}$  (B). Se cuantificó la proliferación celular por la incorporación de timidina a los 3 días con un pulso de 18 hs. Los datos presentados son la media  $\pm$  ESM de los triplicados de cultivo de tres experimentos independientes. ANOVA pos hoc Dunnett para comparaciones múltiples.

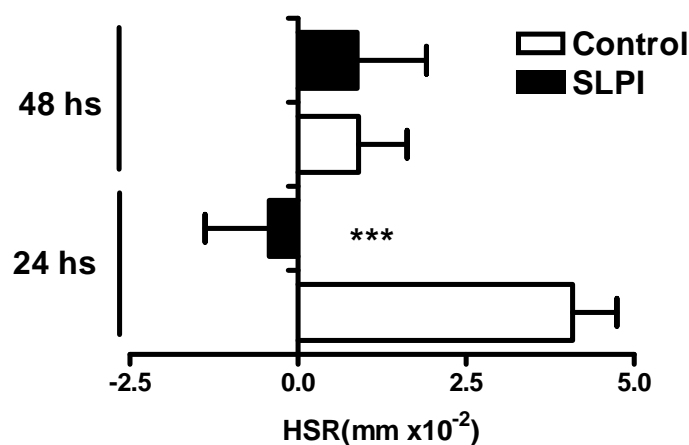
### 3.6. Efecto del SLI en modelos de hipersensibilidad retardada

Luego de observar el efecto inmunosupresor del SLPI en un modelo de EAO también se analizó el efecto del SLPI en dos modelos de hipersensibilidad retardada (HSR) en ratones. En un primer modelo de HSR, se pintó la piel del lomo rasurado de los animales con una solución de 2% DNCB en acetona y nueve días más tarde los animales fueron desafiados en una oreja con 0,05% DNCB o acetona (control) en la otra oreja. Un grupo de ratones recibió la administración subcutánea de SLPI tres días antes de la sensibilización y a lo largo de todos los días del protocolo experimental. La inflamación se cuantificó midiendo el grosor de la oreja con un microcalibre a las 24 y 48 hs luego del desafío. En la Figura 44 se observa que el tratamiento con SLPI inhibió significativamente la inflamación en la oreja solamente a las 48 hs.



**Figura 44. SLPI inhibe la inflamación inducida por DNCB.** Se sensibilizaron los animales pintando la piel del lomo rasurado con 20  $\mu$ l de 2% 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB) en acetona. Nueve días después los animales fueron desafiados en ambas orejas con 10  $\mu$ l de DNCB 0,05% o acetona como control. Un grupo de animales recibieron la administración subcutánea de SLPI 10  $\mu$ g/día, tres días antes de la sensibilización y todos los días del protocolo experimental. Otro grupo de animales control recibió buffer de dilución. La inflamación se evaluó con un microcalibre a las 48 hs. Los resultados representan la media de la diferencia en grosor entre la oreja que recibió DNCB y la oreja que recibió Acetona  $\pm$  ESM para cada grupo. \* $p < 0.05$  (Mann-Whitney test).  $n = 8$  ratones/grupo.

En un segundo modelo de HSR, se utilizaron células alogénicas para sensibilizar a los ratones. Se sensibilizaron ratones BALB/C por la administración intradérmica de  $10^7$  linfocitos obtenidos del bazo y ganglios linfáticos de ratones C57/B6. Siete días después los animales fueron desafiados por la inyección en una oreja de  $10^6$  linfocitos de C57/B6 y en la otra oreja se inyectaron células singéneas de ratones BALB/C como control. Un grupo de animales recibió la administración subcutánea de SLPI 10  $\mu$ g/día, tres días antes de la sensibilización y todos los días a lo largo del protocolo experimental. Mientras que otro grupo recibió buffer (Control). La inflamación se evaluó midiendo el grosor de la oreja con un microcalibre a las 24 y 48 hs. La figura 45 muestra que en los animales tratados con SLPI la inflamación de la oreja fue significativamente menor a las 24 hs. Mientras que no se observan diferencias a las 48 hs. Estos resultados sugieren que el SLPI tiene la capacidad de inhibir la respuesta inmune celular.



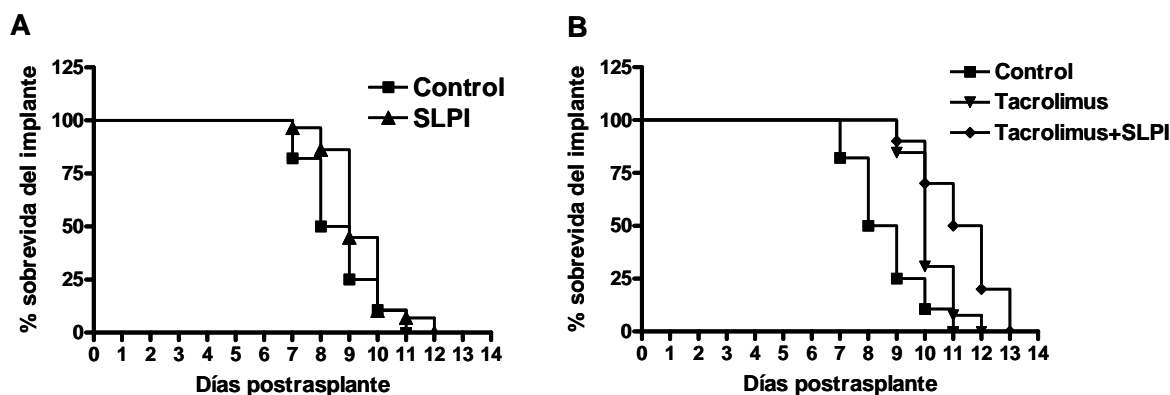
**Figura 45. SLPI disminuye la inflamación en HSR.** Se sensibilizaron ratones BALB/C por la administración de  $10^7$  linfocitos obtenidos del bazo y ganglios linfáticos de ratones C57/B6. Las células fueron inyectadas de forma intradérmica en el vientre de los BALB/C. Siete días después los animales fueron desafiados por la inyección en las orejas de  $10^6$  linfocitos de C57/B6 o células singeneicas de ratones BALB/C. Un grupo de animales recibieron la administración subcutánea de SLPI  $10 \mu\text{g}/\text{día}$ , tres días antes de la sensibilización y todos los días a lo largo del protocolo experimental. Otro grupo de animales control recibió buffer (Control). La inflamación se evaluó con un microcalibre a las 24 y 48 hs. Los resultados representan la media de la diferencia en grosor entre la oreja que recibió células B6 y la oreja que recibió células BALB/C  $\pm$  ESM para cada grupo. \*\*\* $p < 0.001$  (Mann-Whitney test).  $n=8$  ratones/grupo.

### 3.7. Efecto del SLPI en un modelo de trasplante de piel

Generar tolerancia para los órganos trasplantados es la meta de muchas terapias. Las drogas inmunosupresoras, como FK506 o Tacrolimus, inhiben a las células T aloreactivas de manera eficiente. Sin embargo, el tratamiento con este tipo de compuestos puede estar acompañado de varios efectos adversos. Por lo tanto, es necesario establecer otras estrategias para generar inmunosupresión. A partir de los resultados obtenidos que mostraron al SLPI como un inmunomodulador y una vez establecida su capacidad para disminuir la respuesta celular en distintos modelos *in vivo* se decidió evaluar el efecto del

SLPI en un modelo de trasplante de piel entre cepas de ratones histoincompatibles. Para lo cual se utilizaron ratones BALB/C (H-2K<sup>d</sup>) hembra de 8 semanas como receptores y ratones C56/B6 (H-2K<sup>b</sup>) hembra de 8 semanas como dadores. Luego de corroborar que los animales se encontraban correctamente anestesiados, a los receptores (BALB/c) se les rasuro un área aproximada de 10 cm<sup>2</sup> en la región lateral del tórax y se implantó piel obtenida de la oreja de los ratones dadores (C57/B6). Luego, el implante se cubrió con un apósito protector y una cinta hipoalérgica para prevenir que los animales se muerdan en la zona. Los ratones receptores recibieron distintos tratamientos como condicionamiento 3 días previos a la operación y diariamente a lo largo del experimento. Un grupo de ratones fue inyectado con SLPI 10 µg/día de forma s.c. en el flanco, otro grupo recibió Tacrolimus 40 µg/día de forma i.p., un tercer grupo recibió ambas dosis de SLPI y Tacrolimus. Finalmente el grupo control fue inyectado con el buffer utilizado para diluir las drogas. Al 6<sup>to</sup> día se retiraron los apósitos protectores y se evaluó el grado de rechazo del trasplante. Se consideró rechazo cuando el área necrosada superó el 70% del implante. La figura 46 muestra que al 8<sup>vo</sup> día el 60 % de los animales del grupo control presentaban rechazo del injerto; en cambio sólo un 20% de los animales del grupo SLPI (s.c. 10 µg) habían rechazado el injerto. Por otro lado, ninguno de los animales que habían recibido tacrolimus (i.p. 40 µg) o tacrolimus + SLPI presentaron rechazo al 8vo día. Al 9<sup>no</sup> día, se observó un rechazo del 82% para el grupo control, 79 % para el grupo SLPI, 20% para tacrolimus y 25% para tacrolimus+SLPI. Al día 11 el 90 % de los animales que recibieron tacrolimus rechazaron el injerto vs el 50% de los animales que recibieron tacrolimus+SLPI. En este último grupo, el 100% de rechazos se alcanzó al día 13. Este resultado muestra que los animales que recibieron un tratamiento con SLPI, tacrolimus o la combinación de ambos lograron prolongar la sobrevivencia del implante al menos por unos días. Pero si bien el SLPI aumentó la sobrevivencia del implante no pudo generar una tolerancia prolongada del implante.



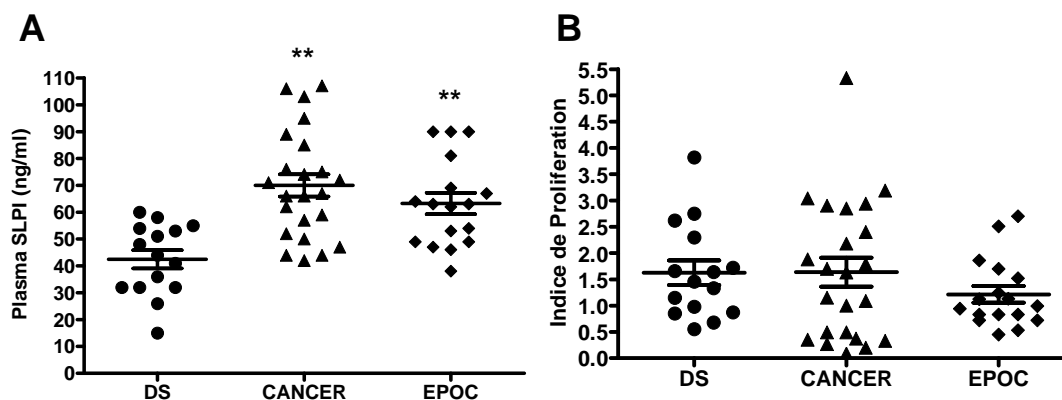


**Figura 46. SLPI prolonga la vida del injerto.** Los animales receptores BALB/c hembra de 8 semanas se les rasuro un área aprox. de 10 cm<sup>2</sup> en el lomo y se realizó un implante de piel obtenida de la oreja de los ratones dadores C57/B6. Los receptores recibieron distintos tratamientos como condicionamiento 3 días previos a la operación y diariamente a lo largo del experimento. Un grupo de ratones fue inyectado con SLPI 10 µg/día de forma s.c. en el flanco y otro grupo el buffer utilizado para diluir las drogas(A). Otro grupo recibió Tacrolimus 40 µg/día de forma i.p., un grupo recibió ambas dosis de SLPI y Tacrolimus (B). Finalmente al 6to día se retiraron los apósitos protectores y se evaluó el grado de rechazo del trasplante. Se consideró rechazo cuando el área necrosada superó el 70% del implante

#### 4. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE SLPI Y PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN Y EPOC.

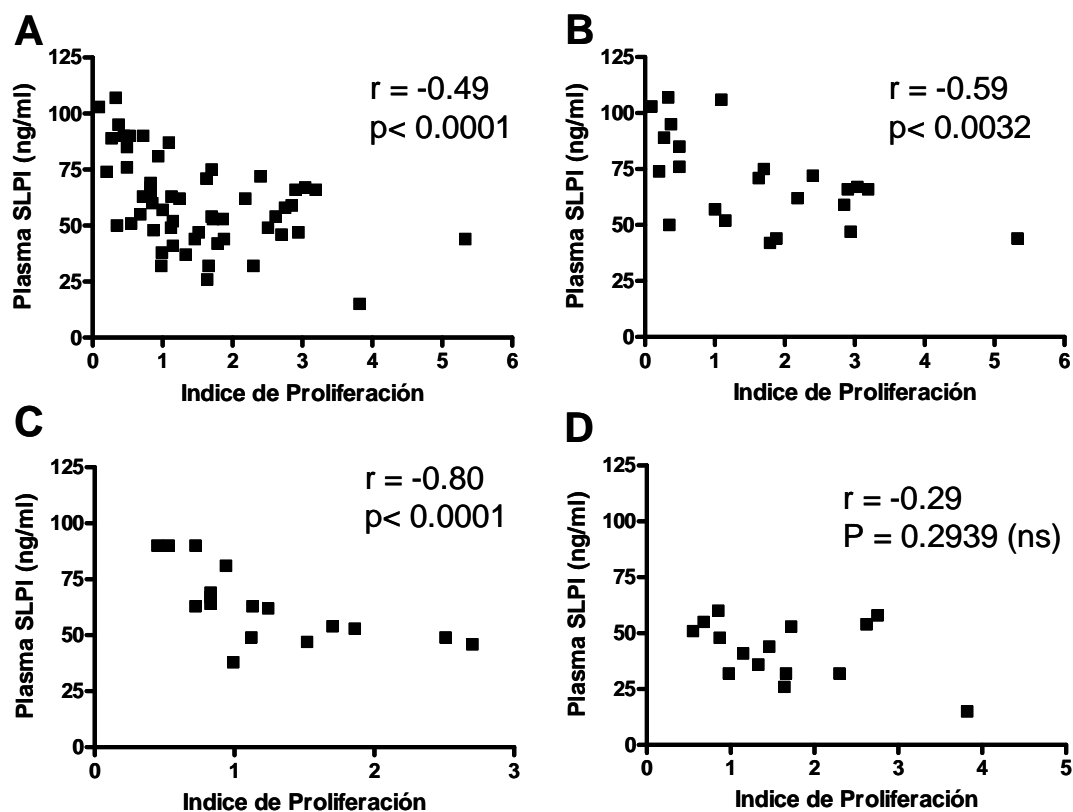
En la última etapa de este trabajo de tesis, se trató de establecer si el efecto del SLPI observado sobre la proliferación linfocitaria *in vitro* podría tener alguna relevancia clínica en algún proceso patológico. Para lo cual se pensó que se debería evaluar los niveles plasmáticos de SLPI y la proliferación *in vitro* de las CMSP en respuesta a un mitogénico. El siguiente punto que se tuvo que considerar fue el tipo de patología clínica a estudiar. Es sabido que niveles elevados de SLPI se podrían encontrar en el plasma de pacientes con procesos infecciosos bacterianos. Sin embargo, se descartó la evaluación de la hipótesis en estos pacientes dado que las citoquinas producidas por la infección bacteriana podrían perturbar los niveles de SLPI plasmático. Por lo tanto, se pensó en patologías pulmonares

no infecciosas porque el epitelio bronquial produce niveles muy importantes de SLPI frente a una injuria. De esta manera, se enrolaron para el estudio pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y pacientes con cáncer de pulmón (Tabla 2 y 3 Materiales y Métodos). Los niveles plasmáticos de SLPI se cuantificaron a través de un ELISA sándwich. La proliferación se cuantificó a partir de CMSP estimuladas con IL-2, obteniéndose un índice de proliferación comparando la proliferación obtenida con una proliferación de un patrón de dadores sanos. La figura 47A muestra que la concentración de SLPI plasmático en pacientes con cáncer de pulmón y EPOC fue significativamente más alta comparado con dadores sanos (DS). Mientras que el análisis de los ensayos de proliferación linfocitaria de sangre periférica evidenció que el índice de proliferación de las células de pacientes con cáncer de pulmón y EPOC no difiere si se comparan con la respuesta de los dadores sanos (Figura 47B).



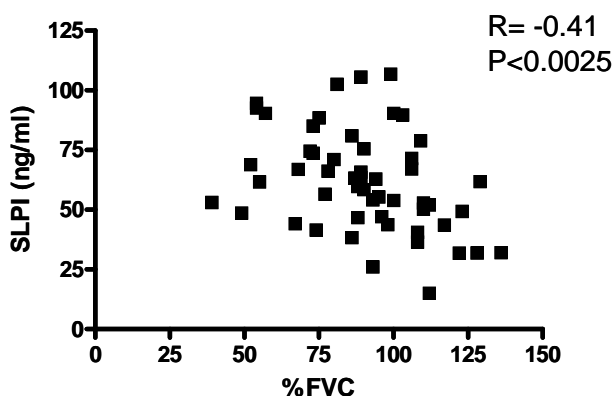
**Figura 47. Concentración plasmática de SLPI y proliferación linfocitaria de dadores sanos, pacientes con cáncer de pulmón y EPOC.** (A) La concentración plasmática de SLPI se cuantificó por ELISA sandwich. (B) La proliferación se cuantificó como indica en la figura 5. La proliferación de células mononucleares de sangre periférica de pacientes fue siempre comparada a la proliferación de dadores sanos realizada en cada ensayo de proliferación. Por eso, la proliferación de células mononucleares de sangre periférica se utilizó como patrón y el índice de proliferación se calculó como: Pacientes (cpm con [IL-2] – control cpm)/Dadores sanos (cpm con [IL-2] – control cpm). En el gráfico se muestra la media  $\pm$  DS para cada grupo. \*\* $p < 0.01$ , ANOVA pos hoc Dunnett para comparaciones múltiples

Sin embargo, a partir del análisis de los datos obtenidos se encontró una correlación significativa entre los niveles plasmáticos de SLPI y el índice de proliferación para los pacientes con cáncer de pulmón (Figura 48B), los pacientes con EPOC (Figura 48C) y para todos los sujetos analizados (Figura 48A). Mientras que no se encontró una correlación para los dadores sanos (Figura 48D). Estos resultados sugieren que los niveles plasmáticos de SLPI podrían ser utilizados como parámetros para predecir el estado inmunológico de los pacientes con cáncer de pulmón y EPOC.



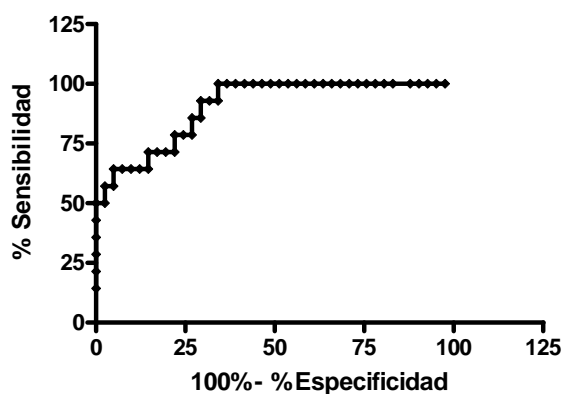
**Figura 48. La concentración plasmática de SLPI se encuentra relacionada negativamente con el índice de proliferación linfocitaria.** Correlación entre SLPI plasmático e índice de proliferación para todo el estudio ( $n = 56$ , A), 24 pacientes con cáncer de pulmón (B), 17 EPOC (C) y 15 dadores sanos (D). Correlación Spearman's Rank test.

Al analizar los niveles del SLPI plasmático en todos los individuos del estudio en relación a la capacidad vital forzada expresada como porcentaje del valor teórico esperado (%FVC) se observa una correlación significativa. Esta correlación muestra que a menor %FVC mayor es el nivel del SLPI plasmático (Figura 49).



**Figura 49. La concentración plasmática de SLPI se encuentra relacionada negativamente con %FVC.** Correlación entre SLPI plasmático y %FVC para todo el estudio (n = 56). Correlación Spearman's Rank test.

Para determinar si el nivel plasmático tiene valor diagnóstico para estas patologías y para establecer un valor de corte se realizó una curva receiver operating characteristic (ROC) con los valores de SLPI plasmático de los dadores sanos y de los pacientes con cáncer de pulmón y EPOC (Figura 50).



**Figura 50. Curva ROC para niveles plasmáticos de SLPI.** El valor del área 0,9042. 95% intervalo de confianza 0.8221 a 0.9863. Controles n=14, Pacientes n= 41. P < 0.0001

A partir de la curva ROC se pudo establecer la sensibilidad y especificidad para los distintos valores de SLPI plasmático. Se puede considerar el valor de 60 ng/ml como un posible punto de corte ya que presenta una sensibilidad de 100% y una probabilidad de obtener falsos negativos es de 34%.

<b>Valor de Corte SLPI Plasmático (ng/ml)</b>	<b>%Sensibilidad</b>	<b>%Especificidad</b>
<b>40</b>	<b>57.2</b>	<b>97.6</b>
<b>50</b>	<b>71.4</b>	<b>78.1</b>
<b>60</b>	<b>100</b>	<b>65.9</b>
<b>70</b>	<b>100</b>	<b>41.4</b>
<b>80</b>	<b>100</b>	<b>24.4</b>

**Tabla 2. Valores Diagnósticos de SLPI plasmático.**

## DISCUSION

Los primeros eventos que llevan al desarrollo de una respuesta inmune adaptativa son mediados por la captura y el procesamiento de antígenos por parte de las CPA. Posteriormente, estas CPA migran hacia los ganglios linfáticos donde interactuarán con los linfocitos. La activación de los linfocitos es un paso esencial para desarrollar una respuesta inmune efectiva. Esta activación provoca la diferenciación y proliferación de los linfocitos hacia sus tipos efectores capaces de reconocer y atacar a los patógenos. El microambiente generado por moléculas y citoquinas presentes al momento de la activación determina los distintos tipos efectores de la respuesta inmune adaptativa. Es precisamente este aspecto, el que fue investigado en esta tesis doctoral.

Dada la localización epitelial del SLPI y su incremento en las primeras etapas de un proceso inflamatorio permitieron especular sobre un posible rol del SLPI en la determinación del perfil de la respuesta inmune. Como se mencionó en la introducción, el SLPI 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 molécula<sup>118</sup>. La misma posee gran afinidad por las serino proteasas neutrofilicas como la elastasa y la catepsina G<sup>117</sup>. El SLPI ha sido caracterizado como moléculas con capacidad anti-inflamatoria debido a su actividad inhibitoria sobre las proteasas que intervienen en los procesos de daño tisular. Además, un número creciente de trabajos avalan la hipótesis de que el SLPI estaría involucrado en fenómenos que facilitarían la resolución de la inflamación al regular eventos relacionados con la generación de tolerancia periférica. Debido a estos antecedentes, en este trabajo de tesis se evaluó una posible participación del SLPI en algunos de los mecanismos de la respuesta inmune celular. En particular, se estudió el efecto del SLPI sobre la proliferación linfocitaria.

En primera instancia se demostró que el SLPI tiene la capacidad de inhibir la linfoproliferación en distintos modelos *in vitro*; efecto muy similar al descrito para otro inhibidor de serino proteasas, presentes a nivel uterino<sup>164</sup>. El efecto inhibitorio del SLPI sobre la proliferación, fue independiente del estímulo utilizado para la inducción de la

proliferación. Por ejemplo, el SLPI logró disminuir la proliferación en cultivos mixtos linfocitarios. En los CML los linfocitos son activados debido al reconocimiento de moléculas de MHC de diferente haplotipo. Mediante la unión del complejo TCR a las moléculas de MHC se produce la activación celular por una cascada de transducción de señales que provoca la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-2, que induce la proliferación y diferenciación de los propios linfocitos. Además, se pudo demostrar que el efecto inhibitorio del SLPI sobre la proliferación también se produce en CMSP estimuladas con IL-2. Debido a que el efecto inhibitorio observado fue dosis dependiente, estos ensayos permitieron proponer para SLPI una nueva función inmunomoduladora de la respuesta celular. El modelo de CML utilizado para evaluar el efecto de SLPI, fue útil como una primera aproximación al problema. La efectividad del SLPI en distintos modelos de proliferación linfocitaria, permitió especular sobre un posible efecto tóxico del SLPI sobre los linfocitos. Sin embargo, esto fue descartado al evaluar la ausencia de apoptosis y necrosis en los ensayos de anexina e Ioduro de Propidio; al menos para el tiempo analizado y en la dosis utilizada.

Como fue mencionado en la introducción el SLPI presenta dos dominios uno de los cuales presenta actividad antiserinoproteasa. Un hecho sobresaliente en la presente tesis, ha sido determinar la independencia del efecto inhibitorio de la proliferación linfocitaria del efecto antiserinoproteasa del péptido. Esto está basado en experimentos que muestran que la molécula de SLPI oxidado que carece de actividad antiproteasa mantiene su actividad inhibitoria sobre la proliferación. Este dato presenta gran importancia fisiopatológica, teniendo en cuenta que la actividad anti-proteasa de la proteína es inhibida en el microambiente inflamatorio por proteasas y compuestos derivados del metabolismo del oxígeno liberados por los neutrófilos. El hecho de que la oxidación no modifique la actividad inhibitoria sobre la proliferación del SLPI, indicaría que este efecto podría persistir aún en el sitio de inflamación. Se conoce la existencia de otras actividades del SLPI que no dependen de la actividad antiproteasa, como por ejemplo la actividad microbicida <sup>165</sup>. Sin embargo, en este trabajo se demostró que los dos dominios de SLPI aislados eran significativamente menos activos que el SLPI nativo. Por lo tanto, es probable que la actividad microbicida resida en el dominio carente de actividad antiproteasa, pero requiera del otro dominio para estabilizar la molécula y lograr un efecto mucho más

marcado. En esta tesis de trabajo, no fue posible evaluar el efecto de cada uno de los dominios del SLPI por separado sobre la proliferación, ya que no disponíamos de los dominios aislados. Sin embargo, será analizado durante el transcurso de este año, una vez que se obtengan cada uno de los dominios por separado.

En los primeros experimentos, el efecto del SLPI sobre la proliferación fue evaluado utilizando CMSP y estímulos mitogénicos inespecíficos. Sin embargo, la utilización de un anticuerpo anti CD3 (OKT3) como estímulo mitogénico permitió especular que el efecto de la inhibición sobre la proliferación linfocitaria, se ejercía sobre los linfocitos T, ya que el anticuerpo OKT3 se une al complejo TCR, y desencadena una cascada de transducción de señales<sup>71</sup> que provoca la expresión de genes proinflamatorios como IL-2 y CD25. Por lo tanto, a esa altura del desarrollo de la tesis fue posible especular que el efecto del SLPI estaría afectando alguno de estos pasos en la cascada de señalización intracelular. Como en todos estos modelos de proliferación linfocitaria analizados, resulta fundamental la expresión de IL-2 y la de su receptor de alta afinidad (CD25), se especuló sobre un efecto del SLPI en la expresión de IL-2 y/o de CD25. Analizados los resultados de los experimentos de citometría de flujo donde se estudiaba la expresión de CD25, se pudo corroborar que el SLPI estaba modificando el estado de activación linfocitaria al disminuir la total expresión de CD25. Además, se corroboró que ese efecto se estaba ejerciendo sobre una subpoblación de linfocitos T, ya que la disminución de CD25 sólo se pudo observar sobre los linfocitos CD4 (**Figura 15**). La disminución en la expresión de CD25 fue mucho menor a los niveles de disminución de la linfoproliferación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta disminución se obtuvo con linfocitos estimulados solamente durante 48 horas mientras que los ensayos de proliferación se realizaron a cinco días. A pesar de no haber medido los niveles de IL-2 en el medio de cultivo, esta serie de experimentos confirmaron la hipótesis, respecto a que el SLPI afecta la expresión de genes proinflamatorios, ya que se demostró que el SLPI disminuye CD25 y que los linfocitos no pueden responder frente al agregado de IL-2.

Un paso clave en la activación linfocitaria es la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Normalmente en células no estimuladas los dímeros de NF- $\kappa$ B están secuestrados en el citosol por una familia de proteínas inhibitoras denominadas I $\kappa$ B. Estos inhibidores enmascaran la secuencia que le permite al NF- $\kappa$ B translocarse al núcleo y unirse al ADN.



De esta manera, mientras I $\kappa$ B $\alpha$  se encuentra unido a los dímeros de NF- $\kappa$ B, ésta no podrá translocarse al núcleo. Desencadenado el proceso activación a través del TCR, se produce la señalización que activan kinasas (denominadas IKK) que fosforilan a I $\kappa$ B $\alpha$  (**Figura 6**). Esta fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  da la señal necesaria para que sea degradado por el proteasoma. Una vez liberado NF- $\kappa$ B, se transloca al núcleo, y se une al ADN, activando la transcripción de genes para citoquinas inflamatorias. La clara inhibición de la degradación proteolítica de I $\kappa$ B $\alpha$  por el agregado de SLPI, permitió concluir que el SLPI impide la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y por lo tanto la transcripción de genes proinflamatorios como IL-2 y CD25 (**Figura 16**). Esta es la primera vez que se describe esta acción del SLPI en linfocitos.

La diferenciación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> hacia los distintos perfiles T colaboradores es un proceso crucial de la inmunidad adaptativa que define el tipo de respuesta frente a patógenos y en definitiva posibles procesos patogénicos como autoinmunidad o respuestas exacerbadas frente a Ag inocuos. Como se mencionó en la introducción existen perfiles definidos de células T colaboradores. Las células Th1 producen un grupo de citoquinas consideradas como proinflamatorias como IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  que favorecen una respuesta inmune adaptativa de tipo celular, modificando la capacidad fagocítica de los macrófagos y activando los linfocitos T citotóxicos. Este tipo de respuesta celular es muy eficiente para la defensa del organismo frente agentes patógenos intracelulares (virus) y, en cierta medida, frente a la progresión de células tumorales. Por el contrario una respuesta de tipo Th2 produce citoquinas consideradas anti-inflamatorias como IL-4, IL-6 e IL-10 que generan las condiciones para la proliferación de linfocitos B activados aumentando de esta forma la producción de anticuerpos. A nivel transcripcional los factores que determinan el perfil de citoquinas son el factor de transcripción T-bet y GATA-3. El primero de ellos es característico de perfiles Th1 y el segundo de perfiles Th2. El SLPI no sólo es capaz de modificar la proliferación de linfocitos, sino también el perfil de respuesta inmune. Esto queda demostrado en los experimentos donde se evalúa la presencia de las citoquinas pertenecientes al perfil Th1 y al perfil Th2. En estos ensayos sobre CMSP resultó por demás interesante observar una gran presencia de IL-6 e IL-10 en los cultivos donde SLPI estuvo presente. Además, se corroboró que el SLPI es capaz de inhibir la producción de IFN- $\gamma$  inducida por un potente inductor de respuestas Th1, como es un lisado de

*Mycobacterium tuberculosis*. *A priori*, estos resultados podrían estar indicando una polarización hacia Th2. Sin embargo, cuando se analizó el efecto del SLPI sobre los factores de transcripción típicos de los perfiles Th1/Th2 se encontró que el SLPI disminuyó significativamente los niveles de T-bet pero no modificó los niveles de GATA-3. Por lo tanto resulta claro que el SLPI disminuye los linfocitos Th1 pero no existen datos concluyentes sobre la inducción de un perfil Th2.

Uno de los puntos más interesantes del presente trabajo se refiere a los posibles blancos de acción del SLPI. ¿Son los linfocitos T el blanco de acción directo del SLPI? Esta pregunta, no podía ser contestada con los modelos de proliferación que se venían utilizando, y además, no existía en la literatura, descripción de receptores de SLPI sobre linfocitos. Sin embargo, existían muchos trabajos donde se describían receptores del SLPI en monocitos, y de hecho, la mayoría de los trabajos publicados, indicaban a los monocitos y macrófagos, como los blancos de acción del péptido. En los experimentos de esta tesis, también resulto claro que el blanco de acción de SLPI, para que se exprese el efecto inhibitorio sobre la linfoproliferación, era mediado por monocitos; dado que el péptido careció de actividad cuando se evaluó en poblaciones de linfocitos depletados de monocitos. Esto fue confirmado, al recuperar el efecto cuando los monocitos fueron reincorporados al cultivo de linfocitos depletados de monocitos y/o al agregar medios condicionados de monocitos pre-tratados con SLPI (**Figura 24**).

Varios han sido los efectos descritos del SLPI sobre monocitos. De hecho, la descripción de la inhibición de I $\kappa$ B fue hecha en monocitos, así como el efecto anti LPS. En este trabajo de tesis, también se pudo observar que el SLPI actúa sobre los linfocitos, no sólo induciendo factores inhibitorios de la linfoproliferación sino también, modificando el fenotipo de las células. Por ejemplo, los monocitos tratados con SLPI presentaron una leve disminución de las moléculas CD14 y MHCII. Por lo tanto, existía la posibilidad que los monocitos pretratados con SLPI ejercieran su actividad inhibitoria a través de moléculas de superficie. Sin embargo, como el efecto supresor de los monocitos pre-tratados con SLPI se encontraba presente en los medios condicionados de monocitos, se excluyó la necesidad de una interacción directa entre el monocito y la célula T para que se manifieste el fenómeno. Es importante aclarar, que el SLPI no está presente en los medios condicionados, ya que los monocitos pre-tratados con SLPI fueron lavados varias veces antes de comenzar a

condicionar el medio. Por lo tanto, el SLPI provoca en los monocitos la liberación de un factor soluble que puede disminuir la proliferación linfocitaria. Este factor soluble bien podría tratarse de alguna citoquina.

Se conoce que un monocito/macrófago es lo suficientemente plástico como para promover respuestas pro o anti inflamatorias. De hecho, actualmente se habla de un espectro de poblaciones monocitos/macrofágicas que tienen la capacidad de promover procesos pro y anti-inflamatorios, hasta incluso cicatrizantes. Dentro de los efectos del SLPI descritos sobre los monocitos se destacan la supresión de PGE2 y metaloproteasas 1 y 9<sup>166</sup>. Siendo que la PGE2 es promotora de un perfil Th2, la supresión de PGE2 llevaría a la inducción de un perfil Th1. Sin embargo, en este trabajo se observó que en los linfocitos tratados con los medios condicionados de monocitos pre-tratados con SLPI se inducen citoquinas que están relacionadas al patrón Th2 como IL-4, IL-6 e IL-10. La posibilidad que estas citoquinas fueran responsables del efecto inhibitorio de la linfoproliferación fue evaluado, agregándolas al cultivo linfocitario en presencia de IL-2. En estos experimentos, se pudo observar que únicamente la IL-4 pudo inhibir la proliferación linfocitaria inducida por IL-2, en la misma proporción que el SLPI. Es importante remarcar, que para estos experimentos, se utilizaron concentraciones de citoquinas similares a las encontradas en los medios condicionados de monocitos pre-tratados con SLPI; sugiriendo que la IL-4 producida por los monocitos podría ser el factor responsable del efecto del SLPI. De hecho, el bloqueo de IL-10 y/o IL-6 no modificó el efecto del SLPI. Por lo tanto, es altamente probable que la IL-4 se responsable del fenómeno, pero faltaría confirmarlo a través de la realización de experimentos de bloqueo de la citoquina.

El efecto inhibitorio sobre la proliferación linfocitaria descrito para el SLPI, contrasta con la promoción de la proliferación celular observada para las células epiteliales del endometrio. Sobre estas últimas, el SLPI actuaría a nivel de la expresión génica aumentando las señales pro-proliferativas y disminuyendo las señales anti-proliferativas<sup>136</sup>. Por lo tanto, es posible que los efectos pro o anti proliferativos del SLPI dependan del tipo celular que se esté analizando.

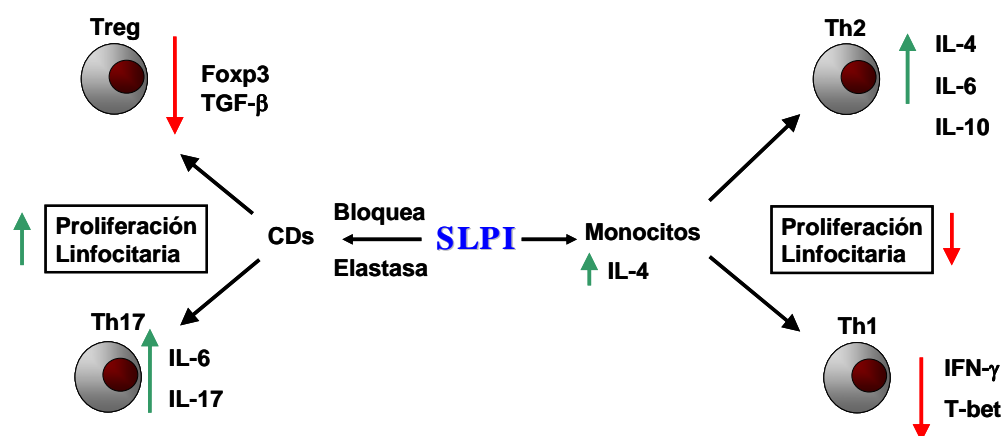
Teniendo en claro que el blanco de acción del SLPI son los monocitos, y que los mismos son críticos para que el efecto se manifieste, quedaría por resolver el posible receptor involucrado en el efecto inhibitorio de la linfoproliferación. Se han postulado al menos dos

recetores para el SLPI; uno es la “scramblase receptor” de la membrana plasmática y el otro es la Annexina II<sup>141</sup>. Pero además, existen trabajos que describen la internalización del SLPI, su unión al sitio de unión de NF- $\kappa$ B y la interferencia en la interacción de la región consenso de NF- $\kappa$ B con p65<sup>155</sup>. Independientemente de cuál sea el mecanismo de acción íntimo que explique el efecto del SLPI sobre los monocitos, no cabe ninguna duda que el SLPI induce la producción de citoquinas del perfil Th2 (IL-4, IL-6, IL-10), ya que éstas fueron medidas en el medio condicionado de monocitos tratados con SLPI. Estos resultados confirman la posibilidad de que el SLPI esté involucrado en un fenómeno de polarización de la respuesta inmune adaptativa.

Las antiproteasas pueden no sólo actuar sobre los monocitos sino que también afectan a las CD4s. Se ha demostrado que el elafin, otro inhibidor de serino proteasas de la familia del SLPI, puede activar CD4s en pulmón en modelos *in vivo* en ratón y llevar la respuesta hacia un perfil Th1<sup>167</sup>. En otro trabajo, se propone que la expresión de SLPI en CD4s contribuye a generar tolerancia<sup>157</sup> al disminuir la producción de agentes proinflamatorios como IL-12 y MCP-1. En este trabajo de tesis se estudió el efecto del SLPI sobre el fenotipo de las CD4s inmaduras y se encontró una leve disminución de MHCII sin modificar la expresión de MHC II. Además, se demostró que los medios condicionados de CD4s pre-tratadas con SLPI tuvieron un efecto opuesto al descrito para los medios condicionados de monocitos al aumentar la proliferación linfocitaria. Por lo tanto, se concluye que el efecto del SLPI sobre la proliferación depende del tipo celular analizado. Es posible que en el cultivo de CMSP, al haber mayor cantidad de monocitos que de CD4s, el efecto preponderante sea el de los monocitos y no el de las CD4s.

Como se mencionó en la introducción, el SLPI es el principal inhibidor local de la elastasa neutrofilica, liberado en respuesta a la elastasa. Por lo tanto es altamente factible que el SLPI se encuentre en un microambiente donde también exista elastasa. Por lo cual, el análisis del efecto del SLPI podría realizarse teniendo en cuenta la presencia de elastasa. Trabajos previos, en nuestro laboratorio, demostraron que la elastasa neutrofilica humana, inhibe la actividad linfoproliferativa de CD4s en cultivos mixtos alogénicos, aumentando simultáneamente los niveles de TGF- $\beta$  y disminuyendo los niveles de IL-6. Como fue mencionado en la introducción, la presencia de TGF- $\beta$  en ausencia de IL-6 polariza a los linfocitos T hacia un perfil regulador. De hecho, el tratamiento de las CD4s con elastasa

produjo un aumento significativo en el número de Treg ( $CD4^+/FOXP3^+$ ) mientras que el tratamiento con SLPI inhibió la expresión de las Treg y la producción de TGF- $\beta$ , y simultáneamente aumentando los niveles de IL-6 e IL-17 (Figura 51). Estos resultados estarían indicando que el SLPI per se inhibiría la expresión del perfil Th1 y, que en presencia de elastasa, inhibiría la expresión de las Treg, favoreciendo la diferenciación hacia un perfil Th17. Esto concuerda, con los resultados obtenidos con los medios condicionados de CDs pre-tratadas con SLPI, donde se observa un aumento de la proliferación linfocitaria, y por lo tanto un estado pro-inflamatorio.



**Figura 51. Rol del SLPI como inmunoregulador.** El SLPI promueve la generación de CDs que aumentan los linfocitos Th17 y disminuyen la producción de linfocitos Treg. Además actuando sobre monocitos bloquea la producción de linfocitos Th1 y aumenta la producción de citoquinas del perfil Th2 *in vitro*.

Resulta contradictorio que la elastasa, una molécula que se encuentran implicadas en procesos inflamatorios como el daño generado por la isquemia-reperfusión, el daño pulmonar agudo inducido por endotoxina y la artritis inducida por colágeno<sup>168,169</sup> pueda estar favoreciendo la generación de células Treg. Se ha demostrado que la elastasa genera una mayor migración de leucocitos y un aumento de moléculas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , CXCL1 y CXCL3<sup>170</sup>. La elastasa neutrofílica aumenta directamente la expresión del mRNA para IL-8 en células del epitelio bronquial por la activación de NF- $\kappa$ B y su traslocación al núcleo. También se demostró que la elastasa neutrofílica contribuye a la

inflamación crónica en las vías aéreas al inducir la producción de mucina por las células epiteliales.<sup>171</sup> Por otro lado, es sorprendente que el SLPI una molécula anti-inflamatoria este inhibiendo las células Treg, principal mecanismo de homeostasis de la respuesta inmune adaptativa, y a su vez favorezca la generación de las células más inflamógenas como son las Th17. Se sabe que las células Th17 son potentes inductores de la inflamación en los tejidos y han sido asociadas con la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes experimentales. Sin embargo, si bien existe una relación recíproca mutuamente excluyente entre las células Th17 y las Treg *in vitro*, todavía no existe evidencia que demuestre que este comportamiento también se observe *in vivo*. La hipótesis que se puede plantear, es que la actividad anti-inflamatoria del SLPI e inflamógena de la elastasa se da en un primer momento en la respuesta inmune innata, la cual podría autolimitarse por los mecanismos homeostáticos. ¿Pero qué sucedería si perdurarán estos estímulos hasta el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa o se mantienen elevados por mucho tiempo? En estos casos, es probable que el efecto generado sea opuesto al deseado y al descrito en la respuesta inmune innata. Este tipo de acción dual y opuesta no es inusual. Por ejemplo, este tipo de comportamiento diferencial en la respuesta inmune innata y adaptativa también fue descrito para el TGF- $\beta$ <sup>172</sup>. Estas acciones fisiológicas de los mediadores, deben diferenciarse de las posibles acciones farmacológicas. Por ejemplo, la capacidad del SLPI de inhibir la expresión de una enfermedad autoinmune del SLPI se puso de manifiesto en un modelo de orquitis autoinmune experimental. La orquitis autoinmune es una entidad caracterizada por una orquitis focal con espermatogénesis que suele acompañarse por un alto nivel de anticuerpos antiespermáticos. Puede ser consecuencia de obstrucción unilateral del conducto deferente, poscirugía o posinfección o manifestaciones de una enfermedad sistémica, como la poliarteritis nudosa u otros cuadros autoinmunes como el síndrome de Sjögren. La orquitis autoinmune experimental (EAO) es una enfermedad mediada sobre todo por linfocitos T, regulada por factores locales, genéticos e inmunitarios. Los signos tempranos de la enfermedad son la infiltración intersticial, perivascular y peritubular de macrófagos y linfocitos TCD4+. Las células germinales son el blanco del ataque inmunológico; se produce apoptosis de espermatoцитos y espermátides, descamación del epitelio germinal, aspermatogénesis e infertilidad. La efectividad del SLPI para inhibir las manifestaciones clínicas de la orquitis sugiere la capacidad “farmacológica”

anti-inflamatoria e inmunosupresora del SLPI en un modelo de enfermedad autoinmune. El mecanismo de acción del SLPI, en el modelo de OAE, no fue examinado. Pero es probable que el efecto sea mediado en la fase efectora del modelo, ya que la administración del SLPI una vez finalizado el período de sensibilización, inhibió las manifestaciones de la enfermedad de la misma manera que cuando se administró al SLPI durante la fase de sensibilización. Cabría preguntarse, ¿Por qué no se puso en evidencia el efecto pro-inflamatorio del SLPI? Seguramente, la expresión de un determinado efecto dependerá de las concentraciones del factor y/o del momento de aparición del factor en el contexto del modelo experimental utilizado. De hecho, la manera de administrar el SLPI, pudo asegurar una cantidad de péptido estable durante la mayor parte del tiempo del experimento, pero estos niveles no fueron elevados, ya que no pudieron ser detectados en sangre periférica realizando un ensayo de ELISA.

En los experimentos realizados en el modelo de enfermedad autoinmune, quedo demostrado que el SLPI presenta un efecto protector en esta patología. Para poder postular al SLPI como una nueva molécula con capacidad inmunomoduladora también se evaluó al SLPI en modelos de HSR y trasplante de piel alogénico. En esta tesis se analizaron reacciones de HSR de tipo IV. Las reacciones de HSR de tipo IV son mediadas por linfocitos T. En un grupo se encuentran aquellas reacciones en las que el daño es inducido por una respuesta inflamatoria mediada por linfocitos Th1 y macrófagos activados como es el caso del modelo generado por la administración de DNCB como hapteno<sup>173</sup>. En otro grupo están las HSR mediadas por la acción de linfocitos T CD8+ citotóxicos en este caso sobre las células alogénicas de ratones histoincompatibles (H2-K<sup>b</sup>→H2-K<sup>d</sup>)<sup>174</sup>. Ambos mecanismos generan lesión en los tejidos. En las HSR la fase de sensibilización se inicia cuando el hapteno o el antígeno ingresan en la piel por primera vez. Son captados por las células de Langerhans en la epidermis y presentadas a los linfocitos T vírgenes en el ganglio linfático regional, lo que conduce a la generación de linfocitos TCD4+ y TCD8+ efectores. Ante un segundo contacto con el antígeno, los linfocitos T efectores son rápidamente reclutados en la piel en el sitio de contacto. El reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T efectores en la piel desencadena la respuesta inflamatoria. Las células CD4+ inducen la activación del macrófago mediante la acción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Mientras que las células T CD8+ pueden destruir las células de la piel. En ambos modelos

el SLPI logró disminuir las lesiones generadas en el sitio de inoculación del antígeno. Por otro lado, el trasplante de piel entre ratones histoincompatibles ( $H2-K^b \rightarrow H2-K^d$ ) puede ser considerado como una reacción de HSR de tipo IV donde las células T CD8<sup>+</sup> eliminan al injerto por el reconocimiento de las moléculas de MHC extrañas. En este modelo el SLPI también demostró su potencial antiinflamatorio ya que los animales tratados con SLPI tardaron más en rechazar el implante. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Schneeberger et al que demuestra que ratones SLPI<sup>-/-</sup> presentan mayor necrosis y menor función cardíaca en un modelo de trasplante cardíaco. Además demuestran que la administración de SLPI en la solución que preserva el tejido durante la isquemia/reperfusión mejora el funcionamiento del implante<sup>175</sup>. ¿Por qué no se pudo mantener por más tiempo la viabilidad del implante en el modelo presentado en esta tesis? Es posible que el efecto dependa de la forma de administración del SLPI. Probablemente la administración subcutánea del SLPI no sea la forma más eficiente de lograr una alta concentración de SLPI en el sitio de interés. Una alternativa sería direccionar al SLPI hacia los tejidos inflamados para mejorar su actividad inmunoreguladora. Sin embargo, el futuro del SLPI como posible droga moduladora con capacidad para regular y controlar la respuesta inmune en procesos patológicos tiene un futuro promisorio.

La relevancia de los hallazgos del SLPI, en cuanto a su efecto inmunomodulador e inmunosupresor, también se pusieron en evidencia en patologías pulmonares. Por ejemplo se pudo observar que los niveles de SLPI sérico se correlacionaban de manera inversa con los niveles de proliferación de células mononucleares de sangre periférica en pacientes con cáncer de pulmón y con EPOC. Se podía haber analizado la correlación entre la proliferación celular y los niveles séricos en otras patologías donde el SLPI muestra valores muy elevados como por ejemplo la neumonía. Sin embargo, se descartó el enrolamiento de pacientes con neumonía para evitar el efecto de citoquinas proinflamatorias inducidas por LPS que podrían estar alterando la proliferación linfocitaria, *pers se*. Es factible que el efecto del SLPI sobre la proliferación no llegue a ser crítica hasta que la concentración de SLPI plasmático alcance un cierto valor. Analizando en forma conjunta los pacientes EPOC y cáncer de pulmón es posible establecer una concentración plasmática de 60 ng/ml como valor de corte. Se necesitaran más trabajos de investigación con pacientes para establecer si la concentración plasmática del SLPI y la proliferación linfocitaria pueden ser utilizadas



como parámetros para realizar un seguimiento de los pacientes o para predecir la evolución de la enfermedad.

La meta de las terapias que tienen como objeto a los neutrófilos es la de suprimir la inflamación como en el caso de la artritis reumatoidea, osteoartritis y EPOC. Sin embargo, las terapias antiinflamatorias tienen varios inconvenientes. Las terapias con corticoides y anticuerpos humanizados, aunque bastante efectivas, tienen el inconveniente de presentar reacciones adversas como por ejemplo la presencia de infecciones o la reactivación de las mismas<sup>176,177</sup>. Una aproximación alternativa podría ser bloquear individualmente alguna enzima de los neutrófilos como la elastasa. En este caso el SLPI podría funcionar como agente terapéutico al bloquear la elastasa y reducir el proceso inflamatorio por sus funciones inmunoregulatoras. Sin embargo, este enfoque puede ser beneficioso pero no garantiza que a través de mecanismos redundantes la inflamación prosiga. Por lo tanto la inhibición de la elastasa sin inhibir la cathepsina G o la protinasa 3 o las metaloproteasas puede no ser suficiente para detener la inflamación<sup>178</sup>.

Como conclusiones generales del trabajo se estableció que el SLPI tiene capacidad inmunomoduladora al inhibir la proliferación linfocitaria actuando directamente sobre los monocitos. Es más, el haber encontrado una correlación negativa entre los niveles de SLPI plasmáticos y la proliferación linfocitaria en pacientes con EPOC y cáncer de pulmón muestra la relevancia de estos descubrimientos. Se demostró también que su mecanismo de acción involucra la inhibición de la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo celular impidiendo la expresión de genes proinflamatorios. Por otro lado se encontró que el SLPI favorece la expresión de citoquinas anti-inflamatorias e inhibe la expresión de un factor de transcripción característico del perfil Th1, disminuye los niveles de Treg y aumento los niveles de Th17 al menos *in vitro*. Sin embargo, en modelos *in vivo* de respuesta inflamatorias exacerbadas el SLPI generó protección frente al daño tisular, una menor respuesta en las pruebas de hipersensibilidad retardada y aumentó la supervivencia de los injertos en animales trasplantados. Estos efectos podrían tener una implicación clínica ya que el SLPI podría ser una nueva herramienta terapéutica en procesos inflamatorios crónicos, en donde la terapéutica clásica haya fracasado.

## CONCLUSIONES

1. El SLPI inhibe la linfoproliferación:
  - 1.1. Independientemente del mitógeno utilizado.
  - 1.2. Independiente de la actividad anti-proteasa.
  - 1.3. Dependiente de la presencia de los monocitos.
  
2. El SLPI modifica el patrón de secreción de citoquinas y factores de transcripción:
  - 2.1. Aumentando IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17.
  - 2.2. Disminuyendo IFN- $\gamma$  y T-bet.
  - 2.3. Disminuyendo el aumento de TGF- $\beta$  y Foxp3.
  
3. El SLPI tiene actividad inmunomoduladora in vivo:
  - 3.1. Inhibiendo las manifestaciones clínicas de la orquitis autoinmune experimental.
  - 3.2. Disminuyendo la HSR
  - 3.3. Aumentando la sobrevida de los injertos de trasplante de piel.
  
4. Los niveles séricos de SLPI se correlacionan con el índice de proliferación de CMSP:
  - 4.1. En pacientes con EPOC.
  - 4.2. En pacientes con Cáncer de pulmón.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Lin KW, Jacek T, Jacek R. Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity. *J Cancer Res Ther.* 2006;2:35-40.
2. Chen ZW. Comparative biology of gamma delta T cells. *Sci Prog.* 2002;85:347-358.
3. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol.* 2000;37:1141-1149.
4. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 1997;9:4-9.
5. Diamond G, Legarda D, Ryan LK. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev.* 2000;173:27-38.
6. Bartlett JA, Fischer AJ, McCray PB, Jr. Innate immune functions of the airway epithelium. *Contrib Microbiol.* 2008;15:147-163.
7. Rogan MP, Geraghty P, Greene CM, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. *Respir Res.* 2006;7:29.
8. Ganz T. Epithelia: not just physical barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:3357-3358.
9. Jean D, Rezaiguia-Delclaux S, Delacourt C, et al. Protective effect of endotoxin instillation on subsequent bacteria-induced acute lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1702-1708.
10. Reppe K, Tschernig T, Luhrmann A, et al. Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40:474-481.
11. Clement CG, Evans SE, Evans CM, et al. Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:1322-1330.
12. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med.* 2008;14:275-281.
13. Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, et al. Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol.* 2003;171:6820-6826.
14. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J.* 2004;23:327-333.
15. Hippenstiel S, Opitz B, Schneck B, Suttorp N. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir Res.* 2006;7:97.
16. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:193-204.
17. Liu YJ, Soumelis V, Watanabe N, et al. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:193-219.
18. Saenz SA, Taylor BC, Artis D. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev.* 2008;226:172-190.

19. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002;296:298-300.
20. Andrews T, Sullivan KE. Infections in patients with inherited defects in phagocytic function. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:597-621.
21. Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, et al. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*. *J Invest Dermatol*. 2001;117:91-97.
22. Zasloff M. Inducing endogenous antimicrobial peptides to battle infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:8913-8914.
23. Elsbach P. What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *J Clin Invest*. 2003;111:1643-1645.
24. Arenas G, Guzman F, Cardenas C, Mercado L, Marshall SH. A novel antifungal peptide designed from the primary structure of a natural antimicrobial peptide purified from *Argopecten purpuratus* hemocytes. *Peptides*. 2009;30:1405-1411.
25. Chertov O, Michiel DF, Xu L, et al. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem*. 1996;271:2935-2940.
26. Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis*. 2001;1:156-164.
27. Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest*. 1989;84:2017-2020.
28. Bowdish DM, Davidon DJ, Speert DP, Hancock RE. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J Immunol*. 2004;172:3758-3765.
29. Shi J, Aono S, Lu W, et al. A novel role for defensins in intestinal homeostasis: regulation of IL-1beta secretion. *J Immunol*. 2007;179:1245-1253.
30. Venge P, Olsson I. Cationic proteins of human granulocytes. VI. Effects on the complement system and mediation of chemotactic activity. *J Immunol*. 1975;115:1505-1508.
31. Faurischou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003;5:1317-1327.
32. Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med*. 1998;4:615-618.
33. Tkalcevic J, Novelli M, Phylactides M, Iredale JP, Segal AW, Roes J. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity*. 2000;12:201-210.
34. Zimmer M, Medcalf RL, Fink TM, Mattmann C, Lichter P, Jenne DE. Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:8215-8219.
35. Adkison AM, Raptis SZ, Kelley DG, Pham CT. Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. *J Clin Invest*. 2002;109:363-371.
36. Garwicz D, Lindmark A, Gullberg U. Human cathepsin G lacking functional glycosylation site is proteolytically processed and targeted for storage in granules after transfection to the rat basophilic/mast cell line RBL or the murine myeloid cell line 32D. *J Biol Chem*. 1995;270:28413-28418.

37. Horwitz M, Benson KF, Duan Z, Li FQ, Person RE. Hereditary neutropenia: dogs explain human neutrophil elastase mutations. *Trends Mol Med*. 2004;10:163-170.
38. Benson KF, Li FQ, Person RE, et al. Mutations associated with neutropenia in dogs and humans disrupt intracellular transport of neutrophil elastase. *Nat Genet*. 2003;35:90-96.
39. Rest RF. Human neutrophil and mast cell proteases implicated in inflammation. *Methods Enzymol*. 1988;163:309-327.
40. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110:21-35.
41. Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*. 2000;407:923-926.
42. Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol*. 1999;65:137-150.
43. Williams MJ. Drosophila hemopoiesis and cellular immunity. *J Immunol*. 2007;178:4711-4716.
44. Franc NC, Dimarcq JL, Lagueux M, Hoffmann J, Ezekowitz RA. Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity*. 1996;4:431-443.
45. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 2006;7:311-317.
46. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity*. 1999;11:753-761.
47. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19:71-82.
48. Auffray C, Fogg D, Garfa M, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317:666-670.
49. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:421-452.
50. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol*. 2007;82:244-252.
51. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, et al. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol*. 2008;86:398-408.
52. Swirski FK, Libby P, Aikawa E, et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest*. 2007;117:195-205.
53. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989;74:2527-2534.
54. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*. 2001;69:11-20.
55. Ziegler-Heitbrock HW, Strobel M, Kieper D, et al. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood*. 1992;79:503-511.
56. Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol*. 2000;67:699-704.
57. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002;168:3536-3542.

58. Mizuno K, Toma T, Tsukiji H, et al. Selective expansion of CD16<sup>high</sup>CCR2<sup>-</sup> subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2005;142:461-470.
59. Fingerle-Rowson G, Auers J, Kreuzer E, Fraunberger P, Blumenstein M, Ziegler-Heitbrock LH. Expansion of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in critically ill cardiac surgery patients. *Inflammation*. 1998;22:367-379.
60. Horelt A, Belge KU, Steppich B, Prinz J, Ziegler-Heitbrock L. The CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol*. 2002;32:1319-1327.
61. Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol*. 2008;67:152-159.
62. Paliard X, de Waal Malefijt R, Yssel H, et al. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell clones. *J Immunol*. 1988;141:849-855.
63. Seder RA, Boulay JL, Finkelman F, et al. CD8<sup>+</sup> T cells can be primed in vitro to produce IL-4. *J Immunol*. 1992;148:1652-1656.
64. Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE. Role of NK1.1<sup>+</sup> T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science*. 1995;270:1845-1847.
65. Moqbel R, Ying S, Barkans J, et al. Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *J Immunol*. 1995;155:4939-4947.
66. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23:549-555.
67. 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.
68. Chen Y, Wood KJ. Interleukin-23 and TH17 cells in transplantation immunity: does 23+17 equal rejection? *Transplantation*. 2007;84:1071-1074.
69. 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.
70. Williams MA, Bevan MJ. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:171-192.
71. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591-619.
72. Sadlack B, Lohler J, Schorle H, et al. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol*. 1995;25:3053-3059.
73. Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*. 1995;3:521-530.
74. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science*. 1995;268:1472-1476.
75. Kundig TM, Schorle H, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM, Horak I. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science*. 1993;262:1059-1061.

76. Bachmann MF, Schorle H, Kuhn R, et al. Antiviral immune responses in mice deficient for both interleukin-2 and interleukin-4. *J Virol.* 1995;69:4842-4846.
77. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature.* 2006;441:890-893.
78. Bachmann MF, Wolint P, Walton S, Schwarz K, Oxenius A. Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections. *Eur J Immunol.* 2007;37:1502-1512.
79. Barton K, Muthusamy N, Chanyangam M, Fischer C, Clendenin C, Leiden JM. Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature.* 1996;379:81-85.
80. Juang YT, Wang Y, Solomou EE, et al. Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV. *J Clin Invest.* 2005;115:996-1005.
81. Bodor J, Bodorova J, Gress RE. Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. *J Leukoc Biol.* 2000;67:774-779.
82. Hwang ES, Hong JH, Glimcher LH. IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *J Exp Med.* 2005;202:1289-1300.
83. Nelson BH, Willerford DM. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol.* 1998;70:1-81.
84. Cantrell DA, Smith KA. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science.* 1984;224:1312-1316.
85. Sojka DK, Bruniquel D, Schwartz RH, Singh NJ. IL-2 secretion by CD4+ T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition. *J Immunol.* 2004;172:6136-6143.
86. Villarino AV, Tato CM, Stumhofer JS, et al. Helper T cell IL-2 production is limited by negative feedback and STAT-dependent cytokine signals. *J Exp Med.* 2007;204:65-71.
87. Gong D, Malek TR. Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production. *J Immunol.* 2007;178:242-252.
88. Kim HP, Kim BG, Letterio J, Leonard WJ. Smad-dependent cooperative regulation of interleukin 2 receptor alpha chain gene expression by T cell receptor and transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 2005;280:34042-34047.
89. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-173.
90. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000;100:655-669.
91. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 2007;8:942-949.
92. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 2007;8:950-957.
93. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature.* 2008;454:350-352.
94. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol.* 2008;9:641-649.

95. Volpe E, Servant N, Zollinger R, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol.* 2008;9:650-657.
96. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity.* 2007;26:371-381.
97. Roncador G, Brown PJ, Maestre L, et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol.* 2005;35:1681-1691.
98. Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, Roifman CM. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3168-3171.
99. Aoki CA, Roifman CM, Lian ZX, et al. IL-2 receptor alpha deficiency and features of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2006;27:50-53.
100. Roifman CM. Human IL-2 receptor alpha chain deficiency. *Pediatr Res.* 2000;48:6-11.
101. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol.* 2001;166:3008-3018.
102. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998;188:287-296.
103. Duthoit CT, Mekala DJ, Alli RS, Geiger TL. Uncoupling of IL-2 signaling from cell cycle progression in naive CD4+ T cells by regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes. *J Immunol.* 2005;174:155-163.
104. Barthlott T, Moncrieffe H, Veldhoen M, et al. CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int Immunol.* 2005;17:279-288.
105. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol.* 2004;172:6519-6523.
106. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2004;34:2480-2488.
107. Jaeckel E, Kretschmer K, Apostolou I, von Boehmer H. Instruction of Treg commitment in peripheral T cells is suited to reverse autoimmunity. *Semin Immunol.* 2006;18:89-92.
108. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* 2004;172:5149-5153.
109. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003;198:1875-1886.
110. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol.* 2004;172:5213-5221.
111. Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol.* 1998;161:6250-6257.



112. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:327-336.
113. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*. 1998;101:890-898.
114. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997;390:350-351.
115. 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.
116. 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.
117. 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.
118. 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.
119. 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.
120. 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.
121. 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.
122. 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.
123. 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.
124. 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.
125. 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.
126. 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.
127. 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.

128. Doumas S, Kolokotronis A, Stefanopoulos P. Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor. *Infect Immun*. 2005;73:1271-1274.
129. 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.
130. 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.
131. 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.
132. Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, et al. Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *J Biol Chem*. 2001;276:33345-33352.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. 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.
137. 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.
138. Ying QL, Kemme M, Simon SR. Functions of the N-terminal domain of secretory leukoprotease inhibitor. *Biochemistry*. 1994;33:5445-5450.
139. Sallenave JM. Antimicrobial activity of antiproteinases. *Biochem Soc Trans*. 2002;30:111-115.
140. 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.
141. 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.
142. Nishimura J, Saiga H, Sato S, et al. Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J Immunol*. 2008;180:4032-4039.
143. 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*. 2009;179:247-253.
144. Verma C, Seebah S, Low SM, et al. Defensins: antimicrobial peptides for therapeutic development. *Biotechnol J*. 2007;2:1353-1359.
145. Saitoh H, Masuda T, Shimura S, Fushimi T, Shirato K. Secretion and gene expression of secretory leukocyte protease inhibitor by human airway submucosal glands. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280:L79-87.

146. van Wetering S, van der Linden AC, van Sterkenburg MA, et al. Regulation of SLPI and elafin release from bronchial epithelial cells by neutrophil defensins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;278:L51-58.
147. Luo BL, Niu RC, Feng JT, Hu CP, Xie XY, Ma LJ. Downregulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor in chronic obstructive lung disease: the role of TGF-beta/Smads signaling pathways. *Arch Med Res*. 2008;39:388-396.
148. Higashimoto Y, Yamagata Y, Iwata T, et al. Adenoviral E1A suppresses secretory leukoprotease inhibitor and elafin secretion in human alveolar epithelial cells and bronchial epithelial cells. *Respiration*. 2005;72:629-635.
149. Jaumann F, Elssner A, Mazur G, Dobmann S, Vogelmeier C. Transforming growth factor-beta1 is a potent inhibitor of secretory leukoprotease inhibitor expression in a bronchial epithelial cell line. Munich Lung Transplant Group. *Eur Respir J*. 2000;15:1052-1057.
150. Ding A, Yu H, Yang J, Shi S, Ehrt S. Induction of macrophage-derived SLPI by *Mycobacterium tuberculosis* depends on TLR2 but not MyD88. *Immunology*. 2005;116:381-389.
151. Weldon S, Taggart CC. Innate host defense functions of secretory leukoprotease inhibitor. *Exp Lung Res*. 2007;33:485-491.
152. 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.
153. Jin F, Nathan CF, Radzioch D, Ding A. Lipopolysaccharide-related stimuli induce expression of the secretory leukocyte protease inhibitor, a macrophage-derived lipopolysaccharide inhibitor. *Infect Immun*. 1998;66:2447-2452.
154. Lentsch AB, Jordan JA, Czermak BJ, et al. Inhibition of NF-kappaB activation and augmentation of IkappaBbeta by secretory leukocyte protease inhibitor during lung inflammation. *Am J Pathol*. 1999;154:239-247.
155. Taggart CC, Cryan SA, Weldon S, et al. Secretory leukoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *J Exp Med*. 2005;202:1659-1668.
156. Odaka C, Mizuochi T, Yang J, Ding A. Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during clearance of apoptotic cells: implications for resolution of the inflammatory response. *J Immunol*. 2003;171:1507-1514.
157. Samsom JN, van der Marel AP, van Berkel LA, et al. Secretory leukoprotease inhibitor in mucosal lymph node dendritic cells regulates the threshold for mucosal tolerance. *J Immunol*. 2007;179:6588-6595.
158. Xu W, He B, Chiu A, et al. Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol*. 2007;8:294-303.
159. Nakamura A, Mori Y, Hagiwara K, et al. Increased susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)-deficient mice. *J Exp Med*. 2003;197:669-674.
160. Zhang Y, DeWitt DL, McNeely TB, Wahl SM, Wahl LM. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *J Clin Invest*. 1997;99:894-900.

161. Song X, Zeng L, Jin W, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. *J Exp Med.* 1999;190:535-542.
162. Wang Z, Zheng T, Zhu Z, et al. Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med.* 2000;192:1587-1600.
163. Recalde HR. A simple method of obtaining monocytes in suspension. *J Immunol Methods.* 1984;69:71-77.
164. 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.
165. Hiemstra RM, J. Stolk, R. Heinzl-Wieland, GJ. Dijkman Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun.* 1996;64:4520-4454.
166. Zhang Y DD, McNeely TB, Wahl SM, Wahl LM. . Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *The Journal of clinical investigation.* 1997;99:894-900.
167. Roghianian A, Williams SE, Sheldrake TA, et al. The antimicrobial/elastase inhibitor elafin regulates lung dendritic cells and adaptive immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34:634-642.
168. Carden DL, Korthuis RJ. Protease inhibition attenuates microvascular dysfunction in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1996;271:H1947-1952.
169. Kawabata K, Hagio T, Matsumoto S, et al. Delayed neutrophil elastase inhibition prevents subsequent progression of acute lung injury induced by endotoxin inhalation in hamsters. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:2013-2018.
170. Young RE, Thompson RD, Larbi KY, et al. Neutrophil elastase (NE)-deficient mice demonstrate a nonredundant role for NE in neutrophil migration, generation of proinflammatory mediators, and phagocytosis in response to zymosan particles in vivo. *J Immunol.* 2004;172:4493-4502.
171. Fischer BM, Voynow JA. Neutrophil elastase induces MUC5AC gene expression in airway epithelium via a pathway involving reactive oxygen species. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;26:447-452.
172. Wahl SM. Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:55-62.
173. Baumer W, Seegers U, Braun M, Tschernig T, Kietzmann M. TARC and RANTES, but not CTACK, are induced in two models of allergic contact dermatitis. Effects of cilomilast and diflorasone diacetate on T-cell-attracting chemokines. *Br J Dermatol.* 2004;151:823-830.
174. Millar JH. The medical library. *Ulster Med J.* 1976;45:47-55.
175. Schneeberger S, Hautz T, Wahl SM, et al. The effect of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) on ischemia/reperfusion injury in cardiac transplantation. *Am J Transplant.* 2008;8:773-782.
176. Roos D, Law SK. Hematologically important mutations: leukocyte adhesion deficiency. *Blood Cells Mol Dis.* 2001;27:1000-1004.
177. Alon R, Etzioni A. LAD-III, a novel group of leukocyte integrin activation deficiencies. *Trends Immunol.* 2003;24:561-566.
178. Luisetti M, Sturani C, Sella D, et al. MR889, a neutrophil elastase inhibitor, in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Eur Respir J.* 1996;9:1482-1486.